UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 N° 5 λ

THÈSE

présentée et soutenue publiquement en Juillet 1969
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(PHARMACIE)

par

Anne-Marie MORGAND-LAUMIN
Pharmacien
Ancien Assistant à la Faculté de Médecine

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CRITIQUE ET EXPÉRIMENTALE DE L'ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE DES ORGANES ET HUMEURS DE VIPÉRA ASPIS, A L'EXCLUSION DU VENIN

Président :
Monsieur DASTUGUE, Professeur

Membres du Jury :
Monsieur VAURS, Professeur
Monsieur BASTIDE, Professeur

GRAPHILUX - AUBIÈRE
1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548623_0048

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 N°

THÈSE

présentée et soutenue publiquement en Juillet 1969
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(PHARMACIE)

par

Anne-Marie MORGAND-LAUMIN
Pharmacien
Ancien Assistant à la Faculté de Médecine

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CRITIQUE ET EXPÉRIMENTALE DE L'ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE DES ORGANES ET HUMEURS DE VIPÉRA ASPIS, A L'EXCLUSION DU VENIN

Président :
Monsieur DASTUGUE, Professeur

Membres du Jury :
Monsieur VAURS, Professeur
Monsieur BASTIDE, Professeur

GRAPHILUX - AUBIÈRE
1969

UNIV.
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE CLERMONT

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Doyen : G. MEYNIEL

Assesseur : M. MERLE

Doyen honoraire : M. CUVELIER
Directeur honoraire : M. MERLE
Professeurs honoraires : Mme BLANQUET, MM. BUREAU, POMMÉ

I. - Professeurs titulaires

MM.	BARRIER	Clinique chirurgicale A.
	BASTIDE	Chimie biologique et Pharmacodynamie.
	BAUDON	Clinique obstétricale.
	BERGER	Chimie analytique.
	BERGERON	Pathologie médicale.
	COULET	Botanique et Microbiologie.
	CUVELIER	Hydrologie et Climatologie.
	DASTUGUE	Biochimie médicale.
	DAUPHIN	Chimie pharmaceutique et Toxicologie.
	DELAGE	Anatomie pathologique.
	FEBVRE	Pharmacie galénique.
	GERMAIN	Clinique chirurgicale B.
	GRAS	Clinique médicale A.
	JACQUEMET	Technique chirurgicale.
	JALLUT	Séméiologie médicale.
	LATAIX	Pathologie chirurgicale.
	MERCIER	Anatomie.
	MEYNIEL	Biophysique médicale.
	MOLINA	Clinique pneumo-phtisiologique.
	PETIT	Médecine légale et Médecine sociale.
	POROT	Clinique neurologique et psychiatrique.
	POURRAT	Matière médicale.
Mlle	RAMPON	Thérapeutique.
MM.	ROUHER	Clinique ophtalmologique.
	TERRASSE	Clinique médicale B.
	THIEBLOT	Physiologie.
	THOMAS	Clinique oto-rhino-laryngologique.
	TRONCHE	Pharmacie chimique.
	TURCHINI	Histologie et Embryologie.
	VAURS	Bactériologie et Hygiène.
	WILLEMIN-CLOG	Clinique médicale infantile.

II. - **Professeurs titulaires à titre personnel**

MM. CHAMPEIX	Médecine légale et Médecine du travail.
VIALLET	Electro-Radiologie.

III. - **Professeurs sans chaire**

MM. ALFIERI	Biophysique médicale.
CLUZEL	Bactériologie.
DUCHENE-MARULLAZ	Physiologie.
MENUT	Pédiatrie et Puériculture.

IV. - **Maîtres de Conférences agrégés**

Mlle CHATONIER	Chimie minérale et Minéralogie.
Mme GAILLARD	Physique pharmaceutique.
Mme MOINADE	Médecine générale et Thérapeutique.
M. PIGNIDE	Médecine générale.
Mme POURRAT	Botanique.
M. VENRIES DE LAGUIL-LAUMIE	Anatomie pathologique.

V. - **Agrégés**

MM. FOURRIER	Orthopédie.
HOUDARD	Chirurgie générale.
JANNY	Neuro-Chirurgie.
RENARD	Pneumo-Phtisiologie.
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie.

VI. - **Délégués dans les fonctions de Maîtres de Conférences**

MM. GENTOU	Biochimie médicale.
MALET	Histologie et Embryologie.
MARCHEIX	Médecine générale et Thérapeutique.
PLAGNE	Cancérologie.

Attaché principal : M. BERTHON
Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation ni improbation. (Délibération en date du 6 juin 1956).

A MES PARENTS

Qui m'ont permis d'accéder à la profession pharmaceutique, en témoignage de ma profonde affection et de ma vive reconnaissance.

A MON MARI

A MES BEAUX-PARENTS

A MA SŒUR ET A MON BEAU-FRERE

A MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Biochimie Médicale
Docteur en Médecine et en Pharmacie
Docteur ès-Sciences
Biologiste des Hôpitaux
Lauréat de l'Académie de Médecine et de l'Académie des Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur
Commandeur de la Santé Publique
Officier des Palmes Académiques
Officier de l'Ordre National du Mérite.

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse et en a guidé sans cesse l'exécution de ses conseils éclairés.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude et de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur VAURS

Professeur de Bactériologie et Hygiène
Chevalier de la Légion d'Honneur
Commandeur des Palmes Académiques
Officier de la Santé Publique

Qui nous a fait l'honneur de juger cette thèse, en témoignage de gratitude et de profond respect.

Monsieur le Professeur BASTIDE

Professeur de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie
Pharmacien chef des Hôpitaux
Chevalier des Palmes Académiques

En témoignage de notre respectueuse gratitude pour tous les conseils qu'il a bien voulu nous prodiguer.

INTRODUCTION

Historique
Travaux du laboratoire

En France, c'est vers la moitié du XVII[e] siècle que les Vipères prennent un regain de célébrité : elles apportent une haute réputation apparemment bien méritée et déjà lointaine qui est surtout d'ordre thérapeutique et qui déjà date d'une vingtaine d'années.

Il s'agit de médicaments nombreux dont elles forment la substance ou la base, le plus réputé de ces médicaments étant la Thériaque, préparée pour la première fois par ANDROMACUS, médecin d'ANNIBAL, de Carthage (III[e] siècle avant J.-C.), électuaire opiacé de composition complexe.

A côté de la Thériaque prirent place successivement comme remèdes : l'Orviétan, le Bézoard animal, l'emplâtre de Vigo et beaucoup d'autres. C'est au XVII[e] siècle, que l'on pourrait surnommer à juste titre « le siècle de la vipérithérapie », que le collège des Apothicaires décida de se réserver la préparation exclusive de la Thériaque. Il chargea en 1667 MOYSE CHARAS de cette mise au point. Ce choix était justifié : les expériences de CHARAS sur la Vipère et « le venin de sa morsure », sa compétence professionnelle valurent à « l'apothicaire artiste » une renommée si étendue, qu'elles le gardèrent d'un humiliant oubli.

Pour quelques-uns de nos praticiens actuels, la Thériaque, ce « chef-d'œuvre de l'empirisme », comme l'a écrit BORDEU, a encore été connu de quelques-uns de nos contemporains, car elle n'a été officiellement rayée du Codex qu'en 1908.

Le XVII[e] siècle, avec les observations et les expériences réalisées d'une part au jardin du Roy et à l'Académie Royale des Sciences par MOYSE CHARAS, d'autre part à Florence par REDI, marque une étape intéressante dans ce qui concerne la Vipère et ses multiples pouvoirs.

Ce n'est qu'au début du XIX[e] siècle que se ralentit peu à peu l'emploi de ces nombreux remèdes à base de Vipère. C'est dorénavant sur son venin et les propriétés de celui-ci que se concentrera essentiellement l'attention des chercheurs. Le prince Lucien BONAPARTE crut pouvoir en extraire la Vipérine en 1843.

En fait, il faut arriver jusqu'à l'ère scientifique des microorganismes et de leurs toxines pour que la question prenne un nouvel élan, une nouvelle direction par la comparaison qui devait s'établir entre les propriétés des toxines microbiennes et celles des venins, qui sont des « toxines renforcées ».

Ce sont les recherches de M. Gabriel BERTRAND qui ont conduit à la découverte de la vaccination et de la sérothérapie contre les venins de Vipère.

Cependant, ces différentes recherches sur le venin ne doivent pas faire méconnaître celles qui ont été entreprises sur la Vipère elle-même. Du point de vue thérapeutique, nous signalerons notamment le « bouillon de peau de Vipère », utilisé par BILLARD et repris par quelques-uns de ses anciens élèves (PITON, DASTUGUE (32), (31) (1934), et également depuis quelque temps l'étude de l'équipement enzymatique de la Vipère entreprise sous l'inspiration du Professeur DASTUGUE et à laquelle se trouve consacré le présent mémoire.

Ce travail sera divisé en deux parties :

— Une partie bibliographique dans laquelle nous rappellerons quelques données anatomiques et physiologiques relatives à la Vipère (chapitre I) et ce que la littérature scientifique nous a révélé sur les enzymes correspondantes (chapitre II).

— Une deuxième partie d'ordre expérimental dans laquelle nous envisagerons successivement :

La conservation des animaux (chapitre I).

Les dosages de référence au niveau des organes (protéines totales ADN et ARN) (chapitre II) et au niveau du sang (hématocrite, vitesse de sédimentation, dosage de l'hémoglobine) (chapitre III).

Dans le chapitre IV, nous décrirons l'obtention des préparations enzymatiques sur lesquelles nous avons travaillé, et enfin, dans les chapitres V à XIII, nous envisageons successivement les activités enzymatiques que nous avons prospectées, à savoir : *lactico-deshydrogénase, ornithine-carbamyltransferase, transaminases, glutamique-oxalo-acétique* et *glutamique pyruvique, cholinesterases, phosphatases acide et alcaline, 5-nucléotidase, invertransferase, transaminases glutamique-oxalo-acétique* et *glutamique pyruvique aldolase.*

Nous ne saurions terminer cette introduction sans exprimer nos bien vifs remerciements aux Maîtres dans les Laboratoires desquels nous avons travaillé : Monsieur le Professeur DASTUGUE et Monsieur le Professeur BASTIDE, ainsi que Monsieur le Professeur VAURS qui a bien voulu nous honorer de sa présence en faisant partie du jury de cette thèse.

Ces remerciements, nous les exprimons également pour l'aide précieuse que nous avons trouvée parmi les travailleurs du Laboratoire de Biochimie Médicale et en particulier pour Madame CAVAGNA, notamment dans le domaine des recherches bibliographiques.

Nous n'omettrons pas non plus le service de l'Institut Pasteur dirigé par le Professeur LAMY et qui a bien voulu, au fur et à mesure de nos besoins, nous fournir la précieuse matière première indispensable à nos recherches.

PREMIERE PARTIE

Recherches bibliographiques

CHAPITRE I

Anatomie et physiologie de la vipère

La *Vipère aspic* qui a fait l'objet de nos dosages enzymatiques est un reptile appartenant à l'ordre des Ophidiens ou Serpents, famille des Vipéridés.

Dans un premier paragraphe, il nous semble intéressant d'exposer, en quelques lignes, les mœurs des serpents en général, de la Vipère en particulier.

Il existe en France, outre huit espèces de Couleuvres, trois sortes de Vipères :

— la *Vipère d'Orsini,* peu répandue, et qui n'a été observée que dans quelques localités du département des Basses-Alpes. C'est la plus petite de nos espèces.

— la *Vipère Bérus* est encore appelée *Vipère du Nord, Vipère noire* ou *Vipère à plaques de Péliade,* selon que l'on se réfère à quelques particularités de son habitat, de sa livrée, ou de ses plaques céphaliques.

— la *Vipère aspic* ou Vipère commune doit ce dernier nom au fait qu'elle est fréquemment rencontrée en France, au Sud de la Loire.

Deux caractères absolus servent à la distinction rapide entre Vipères et Couleuvres :

— les Vipères ont des crochets venimeux et la pupille verticale.

— les Couleuvres n'ont pas de crochets venimeux et ont la pupille circulaire.

Les Vipères présentent le plus haut degré de développement de l'appareil venimeux chez les serpents. Cet appareil est caractérisé par des crochets hypodermiques injectant le venin grâce à un canal permettant son écoulement. En outre, ces crochets (qui sont repliés quand ils ne servent pas) sont projetés par un mouvement de bascule du maxillaire qui les porte en avant, uniquement au moment de frapper.

Les deux familles qui offrent cette disposition de mâchoires sont les Crotalidés et les Vipéridés que l'on désigne sous le nom de Solénoglyphes, par opposition aux Protéroglyphes à crochets antérieurs et à dents fixes (Cobras, Serpents de mer), aux Opistoglyphes à crochets postérieurs, et aux Aglyphes, serpents inoffensifs, sans dents conductrices de venin.

Les Vipères présentent généralement, nous venons de l'affirmer, une pupille elliptique, une queue courte, conique ; leur taille ne dépasse pas 75 cm.

Le genre *Vipera aspis* est caractérisé par une tête élargie en arrière, triangulaire, bien distincte du cou. La tête, plate, possède un museau retroussé, caractère visible d'en haut par l'ombre portée, et plus facilement encore de profil. Au contraire, la *Vipera d'Orsini* a le museau plat, obtus et pointu, et la *Vipera berus* a le museau tronqué, arrondi.

La *Vipera aspis* est de couleur gris jaunâtre, parfois brune, avec des taches noires, une marque en V sur le sommet de la tête. La face ventrale, jaunâtre ou blanchâtre, est ponctuée de taches roses chez la femelle.

C'est de préférence dans des endroits chauds et secs, exposés au soleil, que l'on rencontre la *Vipera aspis :* coteaux boisés, amas de pierres, friches... Elle craint le froid, la pluie, ainsi que la chaleur excessive. Elle n'attaque pas l'homme, mais devient très agressive quand elle est inquiète ou surprise. Elle se nourrit de petits mammifères, rongeurs, insectes, lézards, oiseaux, mais ne chasse jamais dans l'eau les batraciens ou les poissons.

A la fin d'octobre, ou au commencement de novembre, la Vipère disparaît pour prendre ses quartiers d'hiver dans des galeries souterraines. Elle réapparaît selon la température, entre février et avril. L'accouplement a lieu au printemps, et les jeunes vipéreaux (quatre à dix-huit par portée) naissent en août ou septembre.

Il existe de nombreuses autres variétés de vipères vraies telles que *Vipera Xanthina, Vipera Lebetina* qui vivent en Asie, *Vipera Russelli* qui vit aux Indes, et de nombreuses variétés africaines parmi lesquelles la plus redoutable est certainement la Vipère des sables, *Vipera Ammodytes.*

La physiologie proprement dite de la Vipère a été fort peu étudiée. Il semble que les recherches ont porté presque exclusivement sur le venin et son mécanisme de sécrétion. Cependant, il est à noter que le sang de *Vipera aspis* a été l'objet de nombreuses études ; en particulier citons celles de

IZARD, DETRAIT et BOQUET (1961 (50) qui étudient les variations saisonnières de la composition du sang de *Vipera aspis* ; c'est au printemps que le sang de *Vipera aspis* contient le plus de calcium et c'est au seuil de l'été que sa teneur en lipides est la plus grande. La concentration du sodium, du potassium, des sucres réducteurs et du cholestérol demeurent relativement constantes, maintenues vraisemblablement par des mécanismes homéostasiques. Le sang des Vipères capturées est plus nocif au mois de juin qu'au mois d'octobre et, au contraire, l'action anti-toxique du sérum de *Vipera aspis* sur son propre venin est plus grande au mois de septembre qu'au mois de mars.

La coagulation du sang présente un certain nombre de particularités que nous verrons plus en détail au chapitre III de la deuxième partie. Signalons à ce sujet les travaux de Mme JOY et G. DASTUGUE en 1940-41 (51) et en 1943 (53).

Ces mêmes auteurs ont observé des variations saisonnières en ce qui concerne les globules rouges, et ont constaté que la richesse du sang de *Vipera aspis* diminuait au cours de l'hibernation, diminution persistant jusqu'en mai et à laquelle fait suite une augmentation débutant en juin et persistant au moins jusqu'en octobre (52, 53).

Le fonctionnement du cœur a été bien étudié par BILLARD, MOUGEAT et MERLE en 1914 (17). Ces auteurs ont insisté en particulier sur un phénomène observé par eux sur le cœur de la Vipère, et ensuite sur le cœur de la Couleuvre et celui de la Tortue ; il s'agit du rythme à trois temps de la contraction cardiaque, le premier temps étant constitué par une systole coordonnée, massive et rythmique des veines caves supérieure et inférieure, survenant notablement dans la systole auriculaire.

La vésicule biliaire des Vipères a également été examinée et le dosage du cholestérol (méthode de GRIGAUT), pratiqué à plusieurs reprises sur des échantillons provenant de 3 à 5 animaux ; des chiffres variant de 0,16 g à 0,30 g p. 1.000 ont été obtenus (DASTUGUE, 1941) (33).

La dépendance de l'activité de la Vipère par rapport aux saisons a incité AGID et coll. (1961) (1) à étudier également les variations du glycogène hépatique chez *Vipera aspis,* au cours du cycle annuel. Les auteurs concluent qu'il existe un cycle annuel de glycogène hépatique, avec des valeurs maximales à l'automne et minimales en été, contrairement à la glycémie qui présente ses valeurs les plus faibles en hiver et les plus élevées durant la période active.

Il semble aussi que pendant l'hibernation les glandes surrénales sont en repos, puis présentent une forte activité hivernale, un semi-repos estival et une brève poussée active en septembre (MARJOTA et coll., 1961) (64).

L'examen de ces études nous incite à penser que de façon analogue des variations des activités enzymatiques en fonction de la saison sont susceptibles d'exister, ce qui pourrait faire l'objet d'études ultérieures.

CHAPITRE II

Activités Enzymatiques

Le schéma général de la classification des enzymes adopté pour cet exposé est établi selon les « Recommandations of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes » (1964) (42) ; nous le résumons très succintement ci-dessous :

I. — *Oxydoréductases.*

Agissant sur les groupements CH-OH des donneurs (I.I.).

— Avec NAD ou NADP comme accepteur (I.I.I.).
Lactate déhydrogénase (I.I.I.27).
Malate déhydrogénase (I.I.I.37).
Isocitrate déhydrogénase (I.I.I.41).
Glucose-6-phosphate déhydrogénase (I.I.I.49).

Agissant sur le groupement aldéhyde ou cétonique des donneurs (I.2).

— Avec O_2 comme accepteur (I.2.3).
Xanthine : O_2 oxidoreductase (Xanthine oxydase) (I.2.3.2).

Agissant sur le groupement $CH\text{-}NH_2$ des donneurs (I.4).

— Avec un oxygène comme accepteur (I.4.3).
L-Amino-acide-oxydase (I.4.3.2).

Agissant sur le NAD réduit ou NADP réduit (I.6).

— Avec un composé disulfure comme accepteur (I.6.4.).
Lipoamide déhydrogénase (diaphorase) (I.6.4.3).

Agissant sur les diphénols (I.10).

— Avec O_2 comme accepteur (I.10.3).
Tyrosinase (I.10.3.1).

Agissant sur le peroxyde d'hydrogène comme accepteur (I.11).
Catalase (I.11.1.6).

II. — *Transférases.*

Glycosyltransférases ou Transglycosylases (2.4).

— Hexosyltransférases (2.4.1).
Glycogène phosphorylase (α-glucan phosphorylase) (2.4.1.1).

Transférant les groupements N (2.6).

— Aminotransférases ou transaminases (2.6.1).
Aspartate amino transférase (transaminase glutamique-oxalo-acétique) (2.6.1.1).
Alanine amino transférase (transaminase glutamique-pyruvique) (2.6.1.2).

III. — *Hydrolases.*

Agissant sur les liaisons ester (3.1).

— Hydrolases d'esters carboxyliques (3.1.1).
Carboxylestérase (aliestérase) (3.1.1.1).
Lipase (3.1.1.3).
Acetylcholinestérase (3.1.1.7).
Pseudo-cholinestérase (3.1.1.8).

— Hydrolases des monoesters phosphoriques (3.1.3).
Phosphatase alcaline (3.1.3.2).
Phosphatase acide (3.1.3.3).
Nucléotidases (3.1.3.5).

Agissant sur les composés glycosyl (3.2).

— Hydrolases de glycosides (3.2.1).
β-glucuronidase (3.2.1.31).

Agissant sur les liaisons peptidiques (3.4).

— Hydrolases des α-amino-acyl-peptides (3.4.1).
Leucine-amino-peptidase (3.4.1.1).
Aminopeptidases (3.4.1.2 et 3.4.1.3).

— Hydrolases de dipeptides (3.4.3).
Ocytocinase (3.4.3).

Agissant sur les liaisons C-N, autres que les liaisons peptidiques (3.5).

— Dans les Amides linéaires (3.5.1).
Amidases (3.5.1.4).

— Dans les Amidines linéaires (3.5.3).
L-argine uréohydrolase (Arginase) (3.5.3.1).

Agissant sur les liaisons anhydrides d'acide (3.6).

— Dans les anhydrides avec phosphoryl (3.6.1).
Adénosine triphosphatase (3.6.1.3).

IV. — *Lyases.*

Lyases carbone-carbone (4.1).

— Aldéhydes-lyases (4.1.2).
Fructose-diphosphate-aldolase (aldolase) (4.1.2.13).

V. — *Isomérases.*

Oxydoréductases intramoléculaires (5.3).

— Aldoses et cétoses (interconversion) (5.3.1).
Glucosephosphate isomérase (phosphohexose isomérase) (5.3.1.9).

VI. — *Ligases.*

OXYDOREDUCTASES

I. — Enzymes agissant sur les groupements CH-OH des donneurs :

Lactate déhydrogénase.

Poursuivant leurs recherches sur la répartition des activités enzymatiques dans quelques organes et humeurs de *Vipera aspis*, BASTIDE, LAUMIN et DASTUGUE (1967) (15), par la méthode de CABAUD et coll. (25), trouvent une activité enzymatique importante au niveau du cœur et du muscle dorsal.

Dans la zone intermédiaire de la peau de *Natrix natrix*, la *deshydrogénase lactique* apparaît également avec intensité (GOSLAR, 1964) (49).

Malate déhydrogénase et *isocitrate dehydrogénase.*

Les activités *malate déhydrogénasique* et *isocitrate déhydrogénasique* sont également très importantes dans la zone intermédiaire de la peau de *Natrix natrix* (GOSLAR, 1964) (49).

II. — Enzymes agissant sur le groupement aldéhyde ou cétone des donneurs :

Xanthine oxydase.

La présence de *xanthine oxydase* dans le foie des Serpents et son absence dans celui des Lézards, peuvent servir à distinguer l'ordre des Ophidiens et celui des Lacertiliens. Chez la Tortue, elle se trouve principalement dans le foie, mais aussi quelquefois, à l'état de traces dans le rein. (FOUAD, KHALIL et coll., 1960) (46).

III. — Enzymes agissant sur le groupement CH-NH_2 des donneurs :

L-Amino-Acido-Oxydase :

De nombreuses études (ZELLER et coll., 1945, 1946) (96) (97) ont montré que l'enzyme est présente dans le foie, les poumons, les reins et le venin de beaucoup d'espèces de colubridés et de vipéridés, en particulier de la *Vipère européenne.* Les différents organes de la Vipère contiennent environ les

mêmes quantités de *monoamine oxydase* et de *diamine oxydase* que les organes de mammifères correspondants. En 1955, BOULANGER (19) a publié un tableau présentant les spécificités de la *L-Amino-Acide-Oxydase* chez *Vipera aspis* et le Cobra, et fournissant en outre des éléments de comparaison avec le Dindon, le Rat, des invertébrés marins et certains cryptogames.

IV. — Enzymes agissant sur le NAD réduit ou NADP réduit :

Diphosphopyridine-nucléotide-diaphorase et *Triphosphopyridine-nucléotide-diaphorase :*

GOSLAR (1964) (49) relève une forte activité de ces enzymes dans la zone intermédiaire de la peau de *Natrix natrix.*

V. — Enzymes agissant sur les diphénols :

Tyrosinase :

L'activité de la *Tyrosinase* a été étudiée par CHEN et CHAVIN (28) chez les reptiles : dans la peau du dos et dans la peau du ventre chez *Opheodrys, Anobis, Caïman,* et *Trionyx.* Elle s'est avérée relativement faible par rapport à celle des amphibiens, mais plus élevée que dans le tégument normal des oiseaux et des mammifères.

VI. — Enzymes agissant sur le peroxyde d'hydrogène comme accepteur :

Catalase :

MITSUDA (1956) (70) a étudié les températures d'incubation optima pour l'*activité catalasique* de diverses plantes, animaux, etc..., elle varie de 12°5 à 15°, le pH optimum d'environ 7,0 étant identique pour ces variétés.

TRANSFERASES

I. — Glycosyltransférase ou transglycosylases.

Phosphorylases :

Dans la peau de la Couleuvre à collier, *Natrix natrix,* au cours de la phase de synthèse de la couche cornée fraîche, GOSLAR (1964) (49) détecte la présence de glycogène et une activité *phosphorylasique.*

II. — Transférant les groupements N.

Amino-transférases ou transaminases G.O.T. et G.P.T. (*Aspartate amino-transférase. Alanine-amino-transférase*).

Les *amino-transférases* catalysent le transfert du radical-NH_2 d'un amino-acide sur un acide céto-carbonique.

En 1966, BASTIDE, RIGAL et DASTUGUE (14) relèvent chez la Vipère, des activités *GOT* hépatique et rénale voisines de celles rencontrées chez la

Souris. Cette activité est également très marquée dans le cœur et le muscle dorsal ; ils trouvent une activité plus faible dans le foie et plus marquée dans le rein, importante également dans le pancréas et l'estomac, et pour *GOT et GPT* plasmatiques, des activités plus faibles que chez les autres espèces animales.

HYDROLASES

Les *hydrolases* sont des enzymes qui décomposent les molécules d'un substrat avec fixation d'eau au niveau du point de rupture.

I. — Hydrolases d'esters carboxyliques.

Lipases. Aliestérases. Cholinestérases :

Si les publications concernant les *Estérases* sont relativement peu nombreuses à l'heure actuelle, elles embrassent cependant un assez large éventail d'activités enzymatiques : *estérasiques* dans le pancréas de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* (ARVY, 1959) (3) sur des coupes fixées au formol neutre et, pour comparaison, dans les glandes salivaires de *Crocodylus niloticus* (ARVY, 1963) (4). GABE, en 1959 (47), étudiant le rein de *Vipera aspis*, y trouve une activité *aliéstérasique* peu intense par la technique à l'acétate de naphtyle. Des précisions ont été fournies (KASWIN et SERFATY, 1945) (54) concernant un « *système cholinestérasique* » chez *Vipera aspis*, et chez *Tropidonotus natrix* (couleuvre) ; elles sont concrétisées par le nombre de mg d'acétylcholine hydrolysés par 1 g d'organe frais, en 20 minutes, à une température de 20-22°.

Organes	Vipère	Couleuvre
Sérum	2,2	1,6
Névraxe	9,3	10,5
Estomac-intestin	20,5	33
Foie	0,7	1,7
Muscle	0,9	2
Testicule	0,5	—
Ovaire	—	1,2
Glande à venin	7,4	—

Des *estérases* non spécifiques se sont révélées dans tous les segments des néphrons et dans les tubes collecteurs, surtout dans les cellules des tubes contournés proximaux, chez les reptiles, ainsi que chez les urodèles et les oiseaux ; ces activités enzymatiques se sont avérées plus faibles dans la capsule de Bowman chez la Couleuvre, ainsi que, à titre de comparaison, chez l'Axolot et le Pigeon ; en revanche, chez la Couleuvre, la réaction s'est affirmée intensément dans les cellules des tubes contournés distaux ou de la partie glandulaire des segments intermédiaires, surtout dans les parties basales de ces cellules (LABECKA, 1964) (59). La répartition de l'activité *estérasique* a été étudiée chez des reptiles, des poissons et des oiseaux, ainsi

que sa différenciation en plusieurs types d'enzymes et leurs concentrations. Les trois groupes : *arylestérases, aliéstérases* et *cholinestérases* se distribuent différemment suivant les espèces de vertébrés étudiées (AUGUSTINSSON, 1959) (6). Divers substrats ont été soumis à l'action hydrolysante de préparations animales ; citons l'acétate d'α-naphtyl qui n'est pas attaqué par le tissu langerhansien de *Vipera aspis* et de *Vipera berus,* mais l'est fortement par le tissu exocrine (ARVY, 1959) (3). Cet auteur a trouvé, en 1963 (4), une activité *acétyl-naphtylestérasique* dans les glandes salivaires d'*Anguis fragilis,* alors qu'aucune activité *butyryl-thiocholinestérasique* ne s'y est manifestée ; les glandes salivaires de *Crocodilus niloticus* sont très riches en *acétyl-naphtolestérase* (ARVY, 1963) (4). Le pancréas exocrine de l'Anguille n'hydrolyse pas l'acétylcholine, tandis que le pancréas endocrine l'hydrolyse fortement ; chez *Vipera aspis* et chez *Vipera berus,* le pancréas exocrine est intensément *acétyl-naphtolestérasique* et le tissu langerhansien se révèle très riche en *acétyl-cholinestérase,* mais très pauvre en *acétyl-naphtolestérase.*

Par la méthode aux Tweens, appliquée au rein de *Vipera aspis,* la recherche des *lipases* s'avère positive, quoique faiblement (GABE, 1959) (47). Des traces apparaissent dans les cellules des nephrons, des tubes collecteurs et des corpuscules de Malpighi chez les reptiles. Cette réaction est plus vive dans les cellules des tubes contournés proximaux du Lézard, et son intensité ou même sa présence sont très variables dans le rein des oiseaux et des urodèles (LABECKA, 1964) (59).

II. — Hydrolases des monoesters phosphoriques.

Les *phosphomonoestérases* sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des monoesters de l'acide orthophosphorique en acide phosphorique et en alcool ou phénol. Nous sommes amenés à considérer successivement les *phosphatases alcalines* et les *phosphatases acides* en fonction du pH optimum de leur action, et ensuite les *phosphomonoestérases spécifiques.*

1°) *Phosphatase alcaline :*

La présence de la *phosphatase alcaline* est constatée par ARVY (1959) (3) chez *Vipera aspis,* dans les corpuscules rénaux de Malpighi seulement. Une réaction nettement positive de cette enzyme se produit aussi dans la capsule de Bowman des corpuscules rénaux de Malpighi chez le Lézard, la Couleuvre, l'Oie et le Pigeon. Chez la Couleuvre, les éléments entourant immédiatement les tubes contournés distaux ou les parties glandulaires des segments intermédiaires démontrent une nette activité de la *phosphatase alcaline.* Une réaction fortement positive a également été obtenue dans les endothéliums des capillaires sanguins chez toutes les espèces examinées des urodèles, des reptiles et des oiseaux (LABECKA S. et coll., 1964) (59).

En 1959, GABE (47), par l'étude histochimique du rein de *Vipera aspis,* précise que le tube à bordure en brosse du néphron de cet ophidien présente des *activités phosphatasiques* bien établies. Chez la Couleuvre, PALACZ (1963) (76) observe un taux de *phosphatase alcaline* maximum dans les tubes proximaux des néphrons.

LAUMIN, RIGAL, BASTIDE et DASTUGUE (1966) (60) relèvent une activité élevée pour la *phosphatase alcaline* au niveau du rein de *Vipera aspis,* mais constatent que cette teneur demeure à un taux inférieur à celui décelé chez la Souris dans des conditions analogues. Au niveau du foie, cette activité est notablement supérieure chez la Vipère. Il convient également d'indiquer qu'ARVY (1959) (3), au cours de recherches histologiques entreprises sur quelques Vipères des genres *aspis* et *berus,* a constaté que leur pancréas exocrine possède une activité *phosphomono-estérasique alcaline* très faible et le pancréas langerhansien une activité forte, prédominant au niveau des cellules β. Le venin de serpent possède aussi une *phosphatase alcaline,* qui est mise en évidence par TOMOJI en 1958 (90) dans le venin de serpents du Japon et de Formose.

2°) *Phosphatase acide.*

Par des méthodes histochimiques, en 1963, ARVY (5) détecte une très forte activité *phosphatasique acide* dans les glandes salivaires de *Anguis fragilis,* alors que dans celles de *Crocodylus niloticus* les *phosphomono-estérases* sont seulement un peu plus abondantes que dans les alentours de *lamina propria.*

Comme il l'a constaté pour la *phosphatase alcaline,* PALACZ (1963) (76) situe l'activité maximale de la *phosphatase acide* du rein de la Couleuvre au niveau des tubes proximaux des néphrons.

La présence d'une forte activité *phosphatasique acide* dans la couche cornée de la peau a été mise en évidence par GOSLAR (1964) (49) chez *Natrix natrix* (couleuvre à collier).

Par la méthode de SELIGMAN-MANHEIMER, LABECKA et coll. (59), travaillant sur le rein, ont pu démontrer une faible activité de la *phosphatase acide* dans les cellules des segments des reptiles.

Espèces	Cols	Anse Portion grêle	Anse Portion large
Testudo greaca	+	+	0
Tropidonotus natrix	0	+	+
Lacerta agilis	++	++	++

Chez quelques Couleuvres examinées, toujours par application de la technique de SELIGMAN-MANHEIMER, les auteurs ont obtenu une réaction positive très forte dans tout le cytoplasme des cellules des tubes contournés proximaux. Chez les autres individus de cette espèce, ils ont trouvé une activité encore plus forte que dans les tubes contournés proximaux, dans toute la partie supranucléaire des cellules des tubes contournés distaux, ou de la partie glandulaire des segments intermédiaires.

Chez le Lézard, à l'aide de la même méthode, ils ont également montré les différences inhérentes au sexe de l'animal et qui existent dans l'apparition de la *phosphatase acide* dans les cellules des tubes contournés distaux ou de

la partie glandulaire ou muqueuse des segments intermédiaires. Chez les mâles, les auteurs ont révélé une activité *phosphatasique acide* extrêmement intense dans les cellules des tubes contournés distaux ou de la partie glandulaire des segments intermédiaires.

En 1966, LAUMIN, RIGAL, BASTIDE et DASTUGUE (60) relèvent une activité élevée pour la *phosphatase acide* au niveau du rein, activité qui, comparée à celle détectée dans le rein de la Souris, s'avère sensiblement plus importante, alors que dans le foie, elle est pratiquement la même chez la Vipère et la Souris.

3°) *Activités glycérophosphatasique, naphtylphosphatase alcaline :*

A l'aide de méthodes histochimiques, GABE (1959) (47), par la réaction à l'alphanaphtyl-phosphate acide de sodium en milieu alcalin, met en évidence la bordure en brosse avec une électivité parfaite ; la réaction de Gomori au glycérophosphate de sodium colore, surtout lorsque l'incubation est prolongée au-delà de 2 heures, toute la partie supra-nucléaire des cellules de ce segment.

Phosphomonoestérases spécifiques :

Le pancréas des Ophidiens semble dépourvu d'activité 5-*nucléotidasique*, ou tout au moins est très pauvre en cette enzyme : après fixation par l'alcool et coupes à la paraffine, les pancréas de *Thamnophis sirtalis*, d'*Elaphe absoleta absoleta* et de *Natrix sipedon* n'ont pas d'activité 5-*nucléotidasique* (BRAGDON et Mc MANUS, 1952) (21). Par contre, cette activité se révèle faible, uniformément répartie sur de fins granules dans les cellules acineuses du pancréas de *Vipera aspis* et de *Vipera berus* (ARVY, 1959) (3).

Par la méthode de CAMPBELL (1962) (26), BASTIDE, LAUMIN et DASTUGUE (15) détectent une *activité* 5-*nucléotidasique* très faible au niveau du foie, de l'estomac, de l'intestin et du cerveau.

III. — Hydrolases des glycosides.

Ce sont des enzymes qui hydrolysent les osides ; on distingue les *oligosaccharidases* et les *polysaccharidases*.

β-*glucuronidase :*

La β-*glucuronidase* est une oligosaccharidase très fortement active dans la couche des cellules basales de la peau de *Natrix natrix* (GOSLAR, 1964) (49).

Chez *Vipera aspis*, LAUMIN, RIGAL, BASTIDE et DASTUGUE (1966) (60), par la méthode de TALALAY et FISHMAN (89) qui consiste à évaluer la phénolphtaléine libérée du phénolphtaléine glucuronide, après incubation à pH 4,5 à 37°C, relèvent une activité β-*glucuronidasique* élevée au niveau du foie et du testicule. Comparée aux résultats obtenus antérieurement dans des conditions identiques chez la Souris, les auteurs constatent qu'en ce qui concerne le rein, l'activité β-*glucuronidasique* est sensiblement analogue ; dans le foie, cette activité reste plus importante chez la Souris.

IV. — Hydrolases des peptides.

Les peptidases, ou enzymes protéolytiques, scindent la liaison peptidique unissant entre eux les acides aminés ou les peptides.

Leucine-amino-peptidase.

Dans les organes de *Vipera aspis,* BASTIDE, RIGAL et DASTUGUE (1966) (14), dosent la *leucine-amino-peptidase* par appréciation photocolorimétrique, après diazotation, de la β-naphtylamine libérée lors de l'incubation à 37°C du leucyl-β-naphtyl-amide. L'activité *leucine-amino-peptidasique* est particulièrement importante dans l'intestin et le colon, et se retrouve nettement dans tous les organes étudiés, ainsi que dans les hématies. L'activité rénale de cette enzyme est presque aussi élevée chez *Vipera aspis* que chez le Rat et la Souris.

GOSLAR (1964) (49) note une activité *amino-peptidasique* fortement positive dans la couche des cellules basales de la peau de la Couleuvre à collier *Natrix natrix.* La même année, EKRENSING (41) décèle une *leucyl-naphtyl-amidase* très active dans le plasma du Serpent d'eau *Natrix rhombifera.* Ce même auteur compare l'activité *ocytocinasique* du plasma de certains Serpents, de la Tortue et du Poulet : alors qu'elle n'est pas décelée dans le plasma des autres espèces, l'*ocytocinase* n'apparaît que dans le plasma du Serpent *Natrix rhombifera.* Son taux est du même ordre de grandeur que celui rencontré dans le plasma de femmes au 8e mois de la grossesse. L'auteur pense que l'*ocytocinase* du plasma de Serpent doit servir à régulariser les taux plasmatiques de l'hormone ocytocique ; la neurohypophyse des Serpents produit la 8-arginine-ocytocine. Chez les primates, l'*ocytocinase* régularise, présume-t-on, les taux sanguins d'ocytocine durant la grossesse. Bien que *Natrix rhombifera* soit aussi un vertébré, vivipare, son activité *ocytocinasique* n'apparaît pas uniquement comme une fonction exclusive de la régulation des taux de l'ocytocine sanguine, durant la parturition. Le sexe de l'animal ne semble pas intervenir dans l'activité de l'*ocytocinase :* cette enzyme est aussi active chez le Serpent mâle que chez le Serpent femelle.

V. — Agissant sur les liaisons -C-N autres que les liaisons peptidiques :

Arginase :

L'activité *arginasique* n'est pas décelée dans le foie des Crocodiles, des Lézards et des Serpents étudiés par FOUAD KHALIL en 1960 (46). La présence d'*arginase* dans le rein des Reptiles uricoteliques prouve que cet organe est le lieu de formation de l'urée excrétée par ces animaux.

VI. — Agissant sur les liaisons anhydrides d'acide :

Adénosine-triphosphatase :

Le pancréas exocrine de *Vipera aspis* et *Vipera berus* s'avère riche en *adénosine-triphosphatase* (ARVY, 1959, 1963) (3) (5), le tissu langerhansien n'hydrolysant pas l'adénosine triphosphate. Par contre, l'activité *ATPasique* est nulle au niveau du plasma de *Vipera aspis* (BASTIDE, LAUMIN et DASTUGUE (1967) (15).

LYASES

Aldéhydes-lyases :

Fructose diphosphate aldolase :

La *fructose diphosphate aldolase* catalyse la transformation du fructose 1-6-diphosphate en phospho-3-glycéraldéhyde et phospho-3-dihydroxyacétone.

En 1967, BASTIDE, LAUMIN et DASTUGUE (15) ont détecté une forte activité *fructose* 1-6-*diphosphoaldolase* au niveau du cœur et du muscle dorsal de *Vipera aspis*, par la méthode de SIBLEY et coll. (1949) (84).

ISOMERASES

Oxydoréductases intramoléculaires :

Glucosephosphate isomérase (*phosphohexose isomédase = PHI*).

La répartition de la *phosphohexose isomérase* dans quelques organes et humeurs de *Vipera aspis* (venin exclu) a été étudiée par DASTUGUE, BASTIDE et MARTIN, en 1965 (36), et, comparativement à la grenouille (*Rana esculenta*), au cobaye (*Cavia cobaya*) et à la tortue (*Testudo graeca*) par MARTIN (66) à la même époque. Dans les deux cas, la *phosphohexose isomérase* est appréciée d'après une modification de la technique de BODANSKY (18) décrite par BASTIDE et coll. (11). Le taux de conversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate après incubation à 37° C est mis en évidence par la coloration rouge donnée, à 80° C, par le fructose avec le résorcinol en présence d'ions ferriques.

Les principaux organes de *Vipera aspis* présentent une activité *phosphohexose-isomérasique* notable, particulièrement marquée au niveau du muscle squelettique, du rein et du foie, moins importante au niveau du myocarde, de la musculature lisse et des poumons, encore très marquée pour les hématies, et faible, bien qu'appréciable, au niveau du plasma. Comparée au taux d'activité enzymatique rencontré chez diverses espèces animales (*Helix pomatia, Rana esculenta, Testudo graeca, Cavia cobaya,* etc...), la richesse des organes de *Vipera aspis* en *P.H.I.* est du même ordre de grandeur que celle que l'on peut trouver de façon correspondante soit chez les poïkilothermes, soit chez les oiseaux et les mammifères, et même dans certains cas, elle peut leur être supérieure, notamment pour ce qui est des hématies, ce que permet de supposer un catabolisme glucidique assez intense.

Le venin de Serpent a été, jusqu'à présent, l'objet d'un grand intérêt, de très nombreuses et très complètes recherches de la part des auteurs. L'action hémolytique du venin de *Vipera aspis* a été étudiée en détail par DASTUGUE, DODEL et Mme DARRAUD en 1940-41 (37) (38). D'autres auteurs se sont penchés sur la grande variété des activités enzymatiques ; citons pour mémoire :

Dans la classe des oxydo-réductases, les travaux de KEARNEY et SINGER (1951 (55), de BARRIO (1954) (7), de YANG et CHANG (1960) (95), de MASTER (1964) (67) et de ZWISLER (1964) (102) sur la *L-amino acide-oxydase* du venin

de différents serpents. Dans le groupe des hydrolases, de très nombreux auteurs ont testé les activités *lécithinasique* et *phospholipasique* des venins des reptiles, en particulier CHEN CHUNG YANG et coll. (1954) (29), KESAMI WAKUI et coll. (1959) (56), DOERY et coll. (1964) (39) ; toujours dans le même groupe, les *estérases* ont très souvent été recherchées : dès 1947, ZELLER et coll. (1947, 1948, 1949) (98), (99), (101), ont étudié les *cholinestérases* du venin. Rappelons également les travaux de BOVET (1947) (20), MOUNTER (1951) (71), CHUAN-CHIUNG-CHANG (1955) (30), LEE (1956) (61), SADAAKI IWANAGA (1956) (81). TABORDA et coll. (1952) (87), et TABORDA (1957) (88) ont étudié la *ribonucléase* et la *désoxyribonucléase* du venin de Serpent.

DEUXIEME PARTIE

Recherches expérimentales

CHAPITRE PREMIER

Conservation des animaux

Les Vipères de race *Vipera aspis* que nous avons utilisées pour notre expérimentation nous ont été fournies gracieusement par le Docteur LAMY, de l'Institut Pasteur, après avoir été dévenimées. Nous les avons conservées dans une cage en verre, elle-même enfermée dans une deuxième cage de sécurité grillagée, le tout en chambre froide à $+4°$C. Les animaux n'ont reçu aucune nourriture, car la Vipère en captivité ne s'alimente pas.

La plupart des animaux supportent très bien pendant des jours et des semaines, voire accidentellement quelques mois, cette semi-hibernation artificielle. Nous n'avons d'ailleurs retenu pour l'expérimentation proprement dite que ceux qui, ramenés à la température du laboratoire, manifestaient de toute évidence une activité, pour ne pas dire une agressivité, aussi grande pour le moins, que celle des animaux en liberté.

CHAPITRE II

Dosages au niveau des organes

A : DOSAGE DES PROTEINES BIURETIQUES.

Nous avons déterminé le taux des protéines biurétiques dans chaque organe de la Vipère par la méthode de FLEURY et EBERHARD (45) au réactif cuprotartrique de GORNALL.

Principe :

Les protéines biurétiques donnent, en présence du réactif cuprotartrique, une coloration violette stable appréciée au photocolorimètre, à 540 m_{μ}.

Réactifs :

1) Solution protéique à concentration convenable (0 à 6 g par litre).

- — Sulfate de cuivre... 1,5 g ;
- — Tartrate double de sodium et de potassium... 6 g ;
- — Soude en pastilles exempte de carbonate (soude + eau à partie égale, filtrer)... 30 g ;
- — Iodure de potassium... 1 g ;
- — Eau distillée... Q.S.P. 1.000 ml.

Conserver à l'obscurité dans un flacon de polythène.

Mode opératoire :

Mélanger : 2 ml de solution de protéines et 8 ml de réactif de Gornall. Abandonner 30 minutes à la température du laboratoire. Apprécier la coloration au photocolorimètre à 540 m_{μ}. Un tube témoin est préparé en remplaçant la solution à doser par une quantité équivalente d'eau distillée.

Etalonnage :

La déviation obtenue au photocolorimètre est comparée à celle des tubes témoins d'une gamme étalon en solution d'albumine à 1 p. 100, réactif

Stalabo (Solution titrée et stabilisée d'albumine à 1 %, fournie par les Laboratoires COOPER MELUN, soit quatre tubes renfermant chacun 2 ml de cette solution d'albumine diluée respectivement au 1/2, 1/4, 1/6 et 1/12 et 8 ml de réactif de Gornall.

Résultats :

Organes	Protéines biurétiques en grammes pour 100 g d'organe frais	σ
Œsophage	6,95	2,3
Estomac	7,5	1,9
Intestin	7,05	3,1
Colon	4,95	1,5
Foie	10,8	2,7
Pancréas	7,20	1,8
Reins	11,40	2,8
Testicules	7,50	1,4
Cœur	7.75	1,5
Poumons	8,0	2,1
Muscle	11,0	3,2
Plasma	6	1,6
Cerveau	1,05	0,9

TABLEAU N° I

Rappelons, à titre de comparaison, que la recherche des protéines biurétiques effectuée au laboratoire en 1967 par RIGAL (80) dans le foie de Souris nous a fourni le chiffre de 15,9 g pour 100 g de tissu frais, taux légèrement supérieur à celui détecté dans le foie de la Vipère. Chez l'Homme, la littérature indique, pour 100 ml de sérum, un taux de protéines d'environ 6 à 8 g, donc sensiblement du même ordre que celui rencontré dans le plasma de Vipère.

B : DOSAGE DE L'A.D.N. et de l'A.R.N.

Le dosage proprement dit des acides désoxyribonucléique (A.D.N.) et ribonucléique (A.R.N.) dans les tissus doit être précédé de leur extraction.

Extraction :

La méthode utilisée est celle de SCHNEIDER (83), modifiée par KULKA et coll. (58). Les tissus sont homogénéisés à l' « Ultra-Turrax » après dilution au 1/50 dans de l'acide trichloracétique à 5 p. 100. Laisser ensuite 1 heure à + 4°C, puis centrifuger à 2.000 t/mn pendant 5 minutes, décanter le surnageant. Remettre le précipité en suspension pour le laver dans le même volume d'acide trichloracétique à 5 p. 100 que celui utilisé pour préparer l'homogénat. Centrifuger, décanter le surnageant. Traiter le précipité avec un volume d'acide trichloracétique à 5 p. 100 rigoureusement égal à celui

employé précédemment ; porter le tout à 90° C pendant 15 minutes ; centrifuger pendant 5 minutes à 2.000 t/mn.

Doser l'A.D.N. et l'A.R.N. sur le surnageant au 1/50.

1. — *Dosage de l'A.D.N.*

Ce dosage s'effectue selon la méthode de DISCHE.

a) Principe :

La diphénylamine donne une coloration bleue avec les 2-désoxypentoses.

b) Réactifs :

Réactif de DISCHE à la diphénylamine : dissoudre 1 g de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique glacial très pur, et ajouter 2,75 ml de SO_4H_2 concentré pur (se conserve peu, refaire tous les deux jours).

Solution étalon à 0,10 g p. 100 dans l'eau distillée d'A.D.N. polymérisé NBCo. (A conserver à + 4° C).

c) Mode opératoire : Mettre dans un tube à essai :

— 1 volume de solution d'A.D.N. à doser (2 ml) ;

— 2 volumes de réactif à la diphénylamine (4 ml).

Chauffer ce mélange à 100° C pendant au moins 10 minutes. Laisser refroidir et mesurer la coloration bleue obtenue au photocolorimètre à 595 $m\mu$.

Etalonnage : Diluer au demi la solution d'A.D.N. par un égal volume d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Porter alors le mélange pendant 15 minutes au bain-marie à 90° C. Répartir ensuite cette solution obtenue dans 6 tubes à essais à raison de 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2 ml. Ajouter de l'eau distillée q.s.p. 2 ml ; traiter alors comme la solution à doser. Cette gamme correspond à 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg d'A.D.N. dans 1 ml de solution à doser.

2. — *Dosage de l'A.R.N.*

Ce dosage s'effectue selon la méthode de MEJBAUM (40 bis).

a) Principe :

Le dosage de l'acide ribonucléique est basé sur la réaction d'un pentose, le ribose, avec l'orcinol en présence de $FeCl_3$ comme catalyseur. Il existe plusieurs modifications se rapportant à la concentration de : HCl, $FeCl_3$, et de l'orcinol. La modification proposée par MEJBAUM est l'une des plus employées.

b) Réactifs :

Réactif de MEJBAUM à l'orcinol, modifié comme suit : 1,7 ml solution de $FeCl_3$ (obtenue en mélangeant : 1 ml solution $FeCl_3$ Prolabo R.P. à 28 % et 9 ml d'HCl concentré).

0,100 g d'orcinol très pur.
HCl concentré q.s.p. 100 ml.

Ce réactif est à refaire tous les jours.

Solution étalon, d'A.R.N. (NBCo Ribose nucléic acid reagent grade NBCo ; P.M. 1303,8 ; N = 16,3 P = 9,5 ; N/P = 1,7) à 0,050 g pour 100 (mettre 5 ml NaOH N/10 pour dissoudre).

c) Mode opératoire :

Mettre dans un tube à essai :

1 volume de solution d'A.R.N. à doser (2,5 ml) ;
1 volume de réactif (2,5 ml).

Porter ce mélange au bain-marie bouillant pendant 20 minutes ; refroidir,

DOSAGE DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUE ET RIBONUCLEIQUE
(Dosages effectués sur 15 Vipères de sexe mâle)

En g p. 100 g d'organe frais	A.R.N.		A.D.N.	
	M	σ	M	σ
Foie	1,165	0,190	0,610	0,124
Reins	0,815	0,116	0,420	0,020
Poumons	0,800	0,132	0,625	0,075
Muscle dorsal	0,34	0,050	0,120	0,090
Testicules	0,945	0,072	0,635	0,063
Estomac	0,935	0,037	0,375	0,047
Intestin	1,055	0,126	0,665	0,084
Colon	0,625	0,079	0,29	0,019
Pancréas	1,66	0,182	0,45	0,042
Cœur	0,5	0,090	0,24	0,07

TABLEAU N° II

et apprécier la coloration verte obtenue au photocolorimètre à 670 mμ

d) Etalonnage :

Diluer au demi la solution étalon d'A.R.N. par un égal volume d'acide trichloracétique à 10 p. 100 ; porter alors 15 minutes au Bain-Marie à 90° C. Répartir la solution obtenue dans 6 tubes à essais à raison de : 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ml. Ajouter de l'eau distillée q.s.p. 2,5 ml, et traiter comme l'A.R.N. à doser. Cette gamme correspond à 0, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 mg d'A.R.N. dans 1 ml de sol. à doser.

Remarque : Dans un surnageant contenant A.D.N. et A.R.N., il faut soustraire de la coloration verte totale donnée par l'orcinol, la densité optique qui revient à l'A.R.N. : pour cela, effectuer la réaction à l'orcinol sur une gamme d'A.D.N. En se rapportant à cette courbe, chercher quelle

densité optique donne à l'orcinol l'A.D.N. trouvé pour cette dilution et la déduire de la densité totale trouvée pour cette dilution par la réaction à l'orcinol.

Résultats :

Les résultats sont rapportés dans le tableau n° II. Rappelons que, chez la souris, RIGAL (80) note un taux d'A.D.N. de 0,478 g pour 100 g de foie frais, alors que celui que nous rencontrons dans le foie de Vipère est de 0,610 g, le taux d'A.R.N. étant de 1,360 g pour 100 g de tissu frais pour la Souris et de 1,165 g chez la Vipère.

CHAPITRE III

Dosages au niveau du sang

A : HEMATOCRITE

Sur le sang de *Vipera aspis,* recueilli sans anticoagulant, nous avons effectué des microhématocrites. Le sang est introduit dans des micro-tubes capillaires de 7,5 cm. Une extrémité des tubes est obturée à la flamme d'un bec Bunsen et la valeur de l'hématocrite est obtenue par lecture sur une réglette Hawksley, après que le sang ait été centrifugé pendant 3 minutes à 12.000 tours-minute dans une centrifugeuse de type « Beckman/Spinco 152 Microfuge ». Les valeurs obtenues pour les hématocrites sont rapportées dans le tableau ci-dessous :

Valeur de l'hématocrite	Nombre et sexe des animaux
33,5	5 ♂
29,75	3 ♂ + 3 ♀
33,5	2 ♂
24,75	1 ♂ + 4 ♀
31,5	5 ♂ + 1 ♀
29,7	1 ♂ + 5 ♀
35,5	4 ♂ + 2 ♀
29	4 ♂ + 2 ♀
29	2 ♂ + 4 ♀
29	4 ♂ + 2 ♀
34	3 ♂ + 3 ♀
34,5	6 ♂
35	4 ♂ + 2 ♀
33	5 ♂ + 1 ♀
34	3 ♂ + 1 ♀

TABLEAU N° III

La moyenne générale de l'hématocrite est de 31,71.

Cette technique serait à reprendre séparément pour chaque sexe. Il y a là incontestablement une lacune qui sera comblée par la suite. La chose est d'autant plus nette que dans l'espèce humaine les valeurs sont tout à fait significatives suivant le sexe : pour l'homme, 45 ; pour la femme, 41.

Notons pour mémoire les résultats obtenus en 1940 par Mme JOY et DASTUGUE (50), par mm^3 :

— Globules rouges : 1.120.000.

— Leucocytes : 4.500 à 22.000.

— Plaquettes : 0.

B - VITESSE DE SÉDIMENTATION

La sédimentation des hématies est un phénomène biologique normalement masqué par la coagulation du sang. la vitesse de sédimentation globulaire est la vitesse avec laquelle se déposent les hématies d'un sang rendu incoagulable dans un tube de calibre donné et à une température déterminée.

On peut apprécier la vitesse de sédimentation :

— soit par le temps que met la colonne globulaire à descendre jusqu'au repère marqué (méthode de LINZENMEIER) ;

— soit par la lecture de la colonne de plasma surnageant après un temps convenu, habituellement une heure (méthode de WESTERGREEN).

Cette dernière méthode est la plus classique ; on utilise comme tube de sédimentation une pipette (de WESTERGREEN) de 25 à 30 cm de longueur et calibrée à 2,5 mm de diamètre intérieur, et graduée en millimètres de 0 à 200 ; elle est maintenue sur un support spécial assurant l'obturation de l'extrémité inférieure des tubes.

Mode opératoire :

On aspire à l'aide d'une poire de caoutchouc fixée à l'extrémité supérieure, le sang citraté (le sang est en effet recueilli sur une solution de citrate à 3,8 p. 100 à raison de 1 volume pour 4 volumes de sang, mais à ce moment il existe une erreur inhérente à une dilution excessive, que l'on peut éliminer en utilisant du citrate en poudre).

L'appréciation de la vitesse de sédimentation du sang de Vipère a été faite d'après la méthode de WESTERGREEN sur tubes verticaux, sur sang citraté et sur sang pur, car le sang de *Vipera aspis* n'a pas tendance à coaguler dans l'intervalle de temps nécessité par l'épreuve.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

	1 heure		2 heures		24 heures	
	M	σ	M	σ	M	σ
Sang citraté	5,6	0,9	12,2	1,3	128	2,4
Sang pur	4,8	0,7	10,7	1,1	101	3,1

TABLEAU N° 4

Rappelons que chez l'homme et chez la femme, les résultats sont différents :

	1 heure	2 heures
Résultats obtenus pour l'homme	2 à 6	5 à 10
Résultats obtenus pour la femme	4 à 9	6 à 12

C : DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE

Les particularités que présente le sang de Vipère ont été décrites par ARGAUD et BILLARD en 1911 (2), et mentionnées par DASTUGUE en 1941 (33) dans son mémoire sur la physiologie des Vipères.

En effet, le sang de Vipère est pratiquement incoagulable, surtout s'il est recueilli directement par ponction cardiaque, c'est-à-dire sans mélange avec aucun suc tissulaire. Cette incoagulabilité semble être en rapport avec l'absence de ce qu'il est convenu d'appeler, chez les mammifères, les plaquettes sanguines, d'où défaut de thromboplastine intrinsèque. Alors, si donc nous observons quelques millilitres de sang recueillis dans un bécher, nous voyons d'abord des globules tomber au fond du récipient. Au bout d'une heure environ, après la saignée, une mince pellicule parsemée de globules se forme à la surface du liquide. En crevant cette pellicule, on peut facilement aspirer, à l'aide d'une pipette, le plasma qui, au-dessous, est resté limpide. Quelques heures après, ce plasma commence cependant à se solidifier et finit par former, au bout de 12 à 24 heures, une gelée tremblotante, irrétractile.

Le sang étudié provenait de Vipères en captivité depuis 6 à 8 semaines. Il a été recueilli par décapitation sans anti-coagulant.

Le dosage de l'hémoglobine a été effectué sous forme d'oxyhémoglobine.

Ce dosage comporte deux parties :

1) Obtention d'une courbe étalon à partir d'un échantillon connu de sang de Vipères.

2) Dosage de l'hémoglobine sous forme d'oxyhémoglobine.

1) *Obtention d'une courbe étalon :*

On opère à partir d'un échantillon de sang de Vipère dont la teneur en hémoglobine est connue. Pour cela, il faut déterminer la teneur en hémoglobine par dosage du fer. Nous avons dosé le fer par la méthode de WONG (93) dont le principe est le suivant : le fer est libéré par action de H_2SO_4 concentré et de persulfate d'ammonium, avec destruction incomplète de la matière organique. Après défécation trichloracétique, le dosage est réalisé photocolorimétriquement à l'état de sulfocyanate ferrique en milieu alcoolo-acétonique qui renforce et stabilise la coloration.

Réactifs :

— Acide sulfurique concentré (D = 1,83).
— Solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 5 g p. 100 ml.
— Solution aqueuse d'acide trichloracétique exempt de fer, à 30 g p. 100 ml.
— Solution alcoolo-acétonique de sulfocyanate d'ammonium à 15 p. 100 ml :

Sulfocyanate d'ammonium		150 g
Eau distillée	q.s.p.	200 ml
Alcool à 90°		400 ml
Acétone		400 ml

Dissoudre le sulfocyanate dans 77 ml d'eau distillée au bain-marie, en amenant la température à 50-60° C. Après refroidissement vers 40°, ajouter l'alcool à 90° et l'acétone, mélanger aussitôt.

— Solution étalon à 0,1 mg de fer par ml :

Alun de fer et d'ammonium cristallisé pur		0,863 g
H_2SO_4		2 ml
Eau distillée	q.s.p.	1.000 ml

Technique :

— Libération du fer.

Dans un tube à centrifuger jaugé de 10 ml, mesurer successivement en agitant après chaque addition :

Sang dilué au 1/5	1 ml
H_2SO_4 concentré	2 ml
Solution de persulfate	1 ml
Eau distillée	4 ml

— Défécation.

Refroidir légèrement en plongeant le tube dans l'eau froide pendant une à deux minutes, puis ajouter :

Acide trichloracétique		2 ml
Eau distillée	q.s.p.	10 ml

Agiter. Centrifuger pendant 1 minute à 3.500 tours/minute environ.

— Dosage du fer.

Prélever 5 ml de surnageant. Ajouter :

Solution alcoolo-acétonique de sulfocyanate	10 ml

Evaluer la coloration obtenue au photocolorimètre. Faire le zéro avec les mêmes réactifs en remplaçant le sang par de l'eau distillée. L'étalonnage est obtenu à partir d'une solution étalon à 0,1 mg de fer par ml ; dans une série de tubes, on met : 0,1, 0,2 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 ml de solution étalon, on complète avec de l'eau distillée à 1 ml et on opère comme précédemment pour la coloration. On rapporte les résultats sur des axes de coordonnées en portant les densités optiques en ordonnées et la concentration en mg de fer par litre en abscisses.

CHAPITRE IV

Préparations enzymatiques

Les animaux, extraits de la cage de verre avec une paire de pinces, étaient sacrifiés par section de la tête à l'aide d'une paire de ciseaux ; l'animal était alors maintenu en position verticale au-dessus d'un bécher afin de recueillir son sang, d'une part en prenant grand soin que la section de la Vipère ne vienne pas en contact avec les bords du bécher et, d'autre part, en évitant de presser le corps de l'animal, ces précautions ayant pour but d'éviter la coagulation du sang par mélange de suc tissulaire. La coagulation du sang chez la Vipère présente en effet un certain nombre de particularités que G. DASTUGUE (33) signale dans son mémoire de 1941 et que ARGAUD et BILLARD (2) avaient déjà décrites en 1911. Le caillot, lorsqu'il commence à se former au bout de quelques heures, est pratiquement irrétractile.

Les organes de Vipères de sexe mâle uniquement, sauf pour le cerveau et le sang pour lesquels nous ne séparions pas les sexes, étaient ensuite prélevés, soigneusement débarrassés de leurs particules graisseuses par dissection, pesés sur balance Mettler, dilués au 1/10 par addition d'une quantité convenable d'eau distillée et broyés à « l'Ultra-Turrax ». Nous avons amené l'homogénat ainsi obtenu, selon la richesse enzymatique de l'organe, à la dilution désirée pour le dosage, par addition d'eau distillée.

Les homogénats d'organes de Vipères ainsi préparés ont donné lieu à différents dosages d'activités enzymatiques ; notons dès à présent que la recherche de l'activité *ornithine-carbamyl-transférasique* dans les organes de Vipères par la méthode de BROWN et GRISOLIA (14 bis) modifiée par BASTIDE et coll. (13) et celle de l'activité *β-h-fructofuranosidasique* (ou *invertase*) par la technique d'incubation de FISCHER et KOHTES (43), et un dosage des sucres réducteurs par la microméthode de NELSON (72) et KING et GARNER (57) utilisée dans le laboratoire par DASTUGUE, BASTIDE et MARTIN en 1962 (65) n'a pas donné de résultats positifs.

Nous avons séparé hématies et plasma par centrifugation à 3.000 tours/minute pendant 10 minutes. Les hématies sont ensuite lavées plusieurs fois dans du sérum physiologique et hemolysées par agitation vigoureuse dans l'eau distillée.

Le dosage effectué sur le sang de Vipères recueilli sans anti-coagulant indique un taux de fer égal à 51,8 mg par litre de sang dilué au 1/5. D'autre part, sachant que les hémoglobines renferment 0,34 p. 100 de fer, la teneur du sang en hémoglobine sera :

$$51{,}8 \times 0{,}34 \times 5 = 88{,}0 \text{ g/l de sang.}$$

Cet échantillon de sang va permettre d'établir la courbe étalon à laquelle on se référera pour les différents dosages de l'hémoglobine.

2) *Dosage de l'hémoglobine sous forme d'oxy-hémoglobine.*

Principe :

Par dilution convenable en milieu aqueux très légèrement ammoniacal d'un volume de sang exactement mesuré, le mélange d'oxy-hémoglobine et d'hémoglobine est libéré, et en présence d'oxygène dissous, l'hémoglobine est pratiquement entièrement transformée en oxy-hémoglobine. On détermine la densité optique de la solution ainsi obtenue à 540 mμ, et on en déduit la concentration en hémoglobine d'après un graphique d'étalonnage établi préalablement.

Etalonnage :

Le sang, dont on a soigneusement déterminé le titre en hémoglobine par dosage du fer, est ramené à une concentration de 100 g d'hémoglobine par litre, à l'aide d'une solution NaCl à 9 g p. 1.000.

A 25 ml de solution diluée d'ammoniaque obtenue en mélangeant :

Ammoniaque officinal		0,6 ml
Eau distillée	q.s.p.	1.000 ml

Ajouter 0,2 ml de sang à 100 g d'hémoglobine par litre. On obtient une solution H. Pour obtenir la gamme étalon, on peut adopter la disposition suivante :

Solution H en ml	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0	0
Eau ammoniacale en ml	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5
Correspondance Hb en g/l	200	160	120	80	40	0

Lire au photocolorimètre à 540 mμ avec réglage du zéro sur la cuve remplie d'eau ammoniacale.

Dosage.

A 25 ml d'eau ammoniacale, ajouter 0,1 ml de sang bien homogénéisé. Lire au photocolorimètre après hémolyse complète et se reporter à la courbe.

Nous avons obtenu les résultats suivants, sur 35 animaux de sexe mâle :

72 g/l, 98 g/l, 72 g/l, 96 g/l, 90 g/l, 94 g/l, 83 g/l, ce qui donne une valeur moyenne d'hémoglobine de 87 g/l de sang total.

Indiquons à titre de comparaison que la teneur moyenne en hémoglobine du sang humain varie de :

— 126 à 165 g/l, pour l'homme,

— 117 à 150 g/l pour la femme.

Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en pourcentage de substrat métabolisé. Sur les différents tableaux figurent :

— le taux des dilutions de l'homogénat ;

— le temps d'incubation ;

— le nombre d'animaux utilisés ;

— les moyennes arithmétiques des pourcentages, M ;

— les écarts standards σ calculés d'après la formule suivante :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (M - M_x)^2}{n - 1}}$$

dans laquelle

Σ = somme ;

M = moyenne arithmétique des résultats ;

Mx = résultat partiel ;

n = nombre d'expériences.

Sans doute eut-il été plus correct sur le plan scientifique pur, d'exprimer ces résultats en Unités Internationales. Mais, outre que ce fait eût pu être assez contestable pour certaines d'entre elles, il nous a paru finalement préférable de nous contenter des pourcentages de substrat métabolisé, pour permettre une meilleure comparaison des résultats entre eux et avec ceux précédemment obtenus au laboratoire.

CHAPITRE V

Activité Lactico-deshydrogénasique

(Lactate déhydrogénase : 1.1.1.27)

La *lactico-déshydrogénase* est une transhydrogénase qui transfert un atome d'hydrogène du donneur sur l'accepteur. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :

ac. β - hydroxy-butyrique + ac. pyruvique ⟶ ac. acétyl-acétique + ac. lactique

En fait, cette réaction est catalysée par un système complexe qui comporte au moins deux enzymes. Ce transfert d'hydrogène nécessite la présence d'un co-enzyme qui est dans ce cas le NAD. La réaction peut être subdivisée de la façon suivante :

ac. β - hydroxy-butyrique ⟶ NADH + H^+ ⟶ ac. lactique
ac. acétyl-acétique ⟵ NAD^+ ⟵ ac. pyruvique

Les enzymes catalysant chacune de ces deux réactions sont :

— la *β-hydroxy-butyrate deshydrogénase,* et

— la *lactico-déshydrogénase.*

Le NAD est seulement le transporteur d'hydrogène d'un système à l'autre.

La *lactico-déshydrogénase,* enzyme nécessitant le N.A.D., a été isolée sous forme cristallisée par STRAUB en 1940 (86) à partir du cœur de bœuf. D'autre part, la composition en amino-acides de plusieurs *lactico-déshydrogénases* a été déterminée par EDSON en 1947.

La *lactico-déshydrogénase* est une oxydo-réductase à N.A.D. catalysant la réaction suivante :

ac. pyruvique + $NADH_2$ ⟷ ac. lactique + NAD

Cette réaction représente une des dernières étapes du catabolisme glucidique en anaérobiose.

GOSLAR, en 1964 (49), a découvert une activité *lactico-déshydrogénasique* dans la peau de *Natrix natrix.*

La méthode de dosage employée est due à CABAUD et WROBLESWKI (25), modifiée par BASTIDE, BAUDON, DASTUGUE et REBIERE (10). Le principe consiste à doser l'acide pyruvique restant, en formant une hydrazone colorée au moyen de la 2-4-dinitrophénylhydrazine en milieu sodique. La coloration est appréciée au photocolorimètre à 400 mμ.

Réactifs :

— Solution de tampon phosphate de pH = 7,8 ;
Solution A : PO_4H_2K M/15 à 9,078 g/1.000 ;
Solution B : PO_4HNa_2, 12 H_2O, M/15 à 23,870 g/1.000 ;
mélanger : 91,5 ml de B et 8,5 ml de A. Vérifier le pH.

— Solution de pyruvate de sodium 0,001 M, soit 110 mg/1 ;
faire la solution dans le tampon, soit 11 mg de pyruvate dans 100 ml de tampon.

— Solution de Diphospho-pyridine-nucléotide réduit, à 10 mg/1 ml d'eau distillée. Utiliser 0,1 ml de solution de $NADH_2$ dans chaque tube à incuber. Faire cette solution dans un bain de glace et l'utiliser immédiatement. Ne se conserve pas.

— Solution de soude 0,4 N.

— Solution de 2-4- dinitro-phényl-hydrazine :

2-4 dinitro-phényl-hydrazine : 200 mg.
HCl concentré : 85 ml.
Eau distillée q.s.p. : 1 litre de réactif.
Conserver à + 4° C à l'obscurité.

Mode opératoire :

Dans chaque tube à essais, introduire 1 ml de solution de pyruvate de sodium et placer à 37° C quelques secondes. Ajouter ensuite : 0,1 ml de solution enzymatique diluée et 0,1 ml de $NADH_2$. Agiter doucement. Incuber au bain-marie à 37° C pendant 15 et 30 minutes.

Arrêter la réaction en ajoutant 1 ml de 2-4 dinitro-phényl-hydrazine. Agiter, sortir du bain-marie et laisser à la température du laboratoire. Au bout de 20 minutes, ajouter 10 ml de soude 0,4 N, boucher et bien agiter par retournement. Passer au photocolorimètre à 525 mμ, au bout de 5 minutes au minimum, 30 minutes au maximum.

Gamme étalon :

Pour l'étalonnage, répartir dans différents tubes : 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 ml de solution de pyruvate 0,0001 M, et 1,2, 1,1, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ml d'eau distillée, correspondant à 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 p. 100 d'activité.

Résultats :

Sur les organes de la Vipère, nous avons effectué les dosages à des dilutions différentes.

Le cœur et le muscle dorsal se sont révélés les organes les plus riches, puisque au 1/2.500, l'activité *lactico-déshydrogénasique* était de 35 p. 100 en 30 minutes ; le muscle dorsal, quoique un peu moins riche, possède une activité égale à 27 p. 100 de substrat métabolisé en 30 minutes pour une dilution de l'homogénat de 1/2.500.

Les reins, le foie, les poumons, le pancréas, les testicules, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, le colon, montrent des activités peu différentes et variant de 19,0 à 33,5 p. 100 de substrat métabolisé en 30 minutes d'incubation pour une dilution de l'homogénat de 1/1.000.

POURCENTAGES MOYENS D'ACTIVITE LACTICO-DESHYDROGENASIQUE DE DIVERS ORGANES ET HUMEURS DE *VIPERA ASPIS*
(Dosages effectués sur 15 mâles)

Temps d'incubation en minutes	15		30		15		30	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/1.000				1/2.500			
Cœur	57,7	5,1	75,8	6,4	25,7	2,2	35,3	3,7
Muscle dorsal	41,7	4,9	62,8	5,5	13,6	1,9	27,0	2,1
	1/500				1/1.000			
Reins	33,2	3,1	46,6	4,2	22,7	2,4	22,6	1,8
Foie	38,0	3,7	60,0	9,5	23,6	3,5	18,0	1,7
Poumons	25,7	4,2	27,6	3,6	19,0	2,1	21,0	2,2
Pancréas	20,4	2,9	26,2	3,4	12,3	1,5	19,0	2,5
Testicules	33,8	3,5	48,5	7,1	23,6	1,8	63,3	5,1
Œsophage	24,6	3,1	29,8	4,1	14,3	1,2	28,0	3,1
Estomac	43,0	5,2	50,2	4,5	26,7	1,9	31,3	3,4
Intestin	32,6	3,3	45,2	3,8	22,2	2,1	23,0	2,2
Colon	28,4	3,8	41,4	4,6	15,2	1,7	33,5	3,2
	1/250				1/500			
Hématies	37,5	3,9	45,0	3,7	26,0	3,0	36,5	3,7
	1/5				1/10			
Plasma	20,0	2,8	27,7	2,5	19,0	4,8	24,0	2,3

TABLEAU N° V

Le plasma possède une activité *lactico-deshydrogénasique* qui, pour être faible, n'en est pas moins intéressante : en effet, on note 24 p. 100 d'activité *lactico-deshydrogénasique* en 30 minutes d'incubation pour une dilution du plasma de 1/10. Quant aux hématies on relève 36,5 p. 100 d'activité pour une dilution de ces dernières de 1/500 en 30 minutes.

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que :

— le foie de Souris, dilué au 1/1.000, révèle une activité *lactico-deshydrogénasique* de 32,7 p. 100 en 15 minutes d'incubation (RIGAL) (80).

— les ovaires de Rates pubères, dilués au 1/1.000, dénotent une activité *lactico-deshydrogénasique* de 12,8 p. 100 en 15 minutes d'incubation (PLAZONNET) (78).

— le rein de Souris, dilué au 1/800, montre une activité *lactico-deshydrogénasique* de 47,4 p. 100, après une incubation de 30 minutes. Dans les mêmes conditions, le rein de Rat présente une activité de 51,4 p. 100 d'acide pyruvique métabolisé (BASTIDE) (9).

— quant au sang de Rat, pour le plasma dilué au 1/10, après 30 minutes d'incubation, nous relevons une activité de 33,2 p. 100, et toujours après un même temps d'incubation, pour les hématies amenées à la dilution du 1/200, 69,0 p. 100 d'acide pyruvique métabolisé (BASTIDE) (9).

— dans l'homogénat d'hépatopancréas de l'Escargot, dilué au 1/50, en une heure d'incubation, il apparaît une activité *lactico-deshydrogénasique* de 39 p. 100 (BASTIDE, BALLADE et DASTUGUE) (12).

CHAPITRE VI

Activités Cholinestérasiques

Acétyl cholinestérase : 2.1.1.7
Pseudo-Cholinestérase : 2.1.1.8

Les *cholinestérases* sont des enzymes capables d'assurer l'hydrolyse de l'acétylcholine indispensable à la conduction de l'influx dans la cellule nerveuse. L'acétylcholine ne se dissocie pas d'emblée en acétate et en choline : suivant la règle générale des processus enzymatiques, il se forme d'abord un complexe *cholinestérase*-acétylcholine qui se dissocie en choline et enzyme acétylée. L'enzyme acétylée va subir à son tour l'hydrolyse pour donner l'acétate et l'enzyme libre. Les *cholinestérases* seraient véhiculées sous forme active par les β-lipoprotéines.

La découverte d'une enzyme capable d'hydrolyser l'acétylcholine est due à LOEWI et NAVRATIL en 1926, mais depuis, on s'est rendu compte que l'enzyme responsable, la *cholinestérase,* présente dans le sérum, est différente par sa spécificité de la *cholinestérase* que l'on peut mettre en évidence dans les érythrocytes et le système nerveux. La *cholinestérase* sérique qui possède un champ d'action très étendu, est désignée de ce fait sous le nom de *pseudo-cholinestérase,* tandis que celle des érythrocytes et du système nerveux constitue la *cholinestérase vraie* (tout au moins dans l'espèce humaine). AUGUSTINSSON et NACHMANSOHN (7) désignent la *cholinestérase vraie* sous le nom d'*acétylcholinestérase.* On la trouve dans la plupart des organismes animaux, même chez les plus primitifs. L'*acétylcholinestérase* prédomine dans le cerveau, les muscles, les surrénales. On trouve des activités sensiblement égales des deux enzymes dans l'estomac, le foie, les poumons. La *pseudo-cholinestérase* se rencontre à des concentrations élevées dans le cœur, l'intestin, la peau, le placenta.

Chez la Vipère, nous avons envisagé simultanément l'étude de ces deux enzymes. Nous avons effectué les dosages sur les différents organes de la Vipère, y compris la pulpe cérébrale.

Le dosage des *cholinestérases* est effectué selon la méthode de VINCENT et coll. (92).

Principe :

L'acétylcholine restant en fin d'incubation est dosée selon la méthode de HESTRIN, c'est-à-dire par l'évaluation de la coloration rouge qu'elle donne avec le mélange hydroxylamine-perchlorure de fer. On mesure l'activité totale d'une part, et l'activité *cholinestérasique vraie* d'autre part, après inhibition de l'enzyme plasmatique par la diéthazine.

Réactifs :

Substrat : Solution d'acétylcholine à 1 pour mille obtenue à partir d'ampoules d'Acécoline renfermant 0,10 g de chlorure d'acétylcholine pour 1 ml, soit 1 ml d'acécoline dans 100 ml de tampon à pH = 7,4, à préparer extemporanément.

Tampon : On utilise un tampon barbital de pH = 7,4 comprenant :

Solution A : barbital sodique 0,05 M (10,31 g/l) ;

Solution B : HCl 0,05 N ;

mélanger 57 ml de solution A et 43 ml de solution B.

— *Solution de chlorhydrate de diéthazine* à 0,4 p. 1.000 dans l'eau distillée. A préparer extemporanément.

— *Solution aqueuse d'acide trichloracétique* à 10 p. 100.

— *Solution d'acide chlorhydrique* 4 N.

— *Solution de perchlorure de fer* 0,37 N dans HCL 0,1 N.

$FeCl_3$ R.P. à 27 p. 100		23 ml
HCl 0,1 N	q.s.p.	100 ml

Conserver cette solution à + 4°.

Solution extemporanée de chlorhydrate d'hydroxylamine ; mélanger :

— 1 volume de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 13,9 p. 100, avec

— 2 volumes de NaOH 3,5 N.

Technique :

Dans une première série de tubes à hémolyse, on introduit :

Préparation enzymatique	0,20 ml
Tampon	0,80 ml

Dans la deuxième série, on met :

Préparation enzymatique	0,20 ml
Diéthazine	0,10 ml
Tampon	0,70 ml

Chauffer tous les tubes à 38° C pendant 2 minutes. Ajouter dans tous les tubes :

Acétylcholine à 1 p. 1.000 ..... 1 ml

Mettre au bain-marie à 38° C pendant deux heures et quatre heures.

En fin d'incubation, ajouter 1 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Agiter, centrifuger.

Dans des tubes à essais, prélever 1,5 ml du surnageant. Ajouter :

Solution d'hydroxylamine ..... 0,4 ml

Puis deux minutes après :

Acide chlorhydrique 4N ..... 0,3 ml
$FeCl_3$ dans HCl ..... 0,2 ml
Eau . . .. 2 ml

Agiter ; lire au photocolorimètre à 520 $m\mu$. Faire le zéro avec les réactifs seuls.

Gamme étalon :

Prendre une série de tubes à hémolyse et introduire successivement : 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ; 1 ml d'acétylcholine à 1 p. 1.000, correspondant à 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0 p. 100 d'hydrolyse, puis 0,2 ml d'eau, tampon q.s.p. 2 ml ; CCl_3COOH 1 ml ; prélever 1,5 ml et procéder à la coloration comme précédemment.

Les résultats obtenus correspondent, pour les tubes de la première série, à la valeur de la *cholinestérase* totale ; pour les tubes de la deuxième série, les valeurs obtenues correspondent aux pourcentages d'activité *cholinestérasique vraie.* Par différence, on obtient le pourcentage d'activité *pseudo-cholinestérasique.*

Les chiffres rapportés dans les tableaux n°s VI, VII, VIII représentent les pourcentages de substrat métabolisé en deux et quatre heures.

Nous observons une forte activité *pseudo-cholinestérasique* au niveau des reins, pour lesquels les dosages sont effectués à des dilutions de 1/10.000 et 1/20.000. Une forte activité *pseudo-cholinestérasique* est également révélée au niveau du cerveau. L'activité *cholinestérasique vraie* est relativement peu importante dans l'ensemble des organes, sauf peut-être au niveau des hématies où elle atteint 42 p. 100 en quatre heures au 1/25 et 23,7 p. 100 en quatre heures au 1/50. Pour le plasma, l'activité *pseudo-cholinestérasique* est nettement supérieure à l'activité *cholinestérasique vraie.*

CHOLINESTERASE TOTALE

Dosages effectués sur 30 Vipères de sexe mâle

Temps d'incutation en heures	2		4		2		4	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/100				1/200			
Œsophage	25,8	5,4	44,6	12,4	9,3	5,6	21,4	8,2
Estomac	47,4	5,0	74,2	6,8	20,5	6,0	39,6	6,7
Colon	15,6	2,9	23,7	1,7	8,6	1,9	14,7	8,2
	1/50				1/100			
Intestin	16,1	2,8	28,0	4,7	9,2	3,3	15,3	6,0
Pancréas	9,3	3,3	19,2	9,8	4,4	4,2	10,3	4,6
Foie	11,8	6,1	18,8	2,2	6,3	2,5	10,6	4,5
Poumons	8,3	4,3	18,3	4,0	6,5	4,4	11,5	2,0
Muscle	15,3	2,3	27,0	5,4	8,7	1,2	15,9	4,0
	1/25				1/50			
Cœur	12,2	1,2	21,2	3,7	5,6	2,3	13,4	1,3
Hématies	27,3	4,1	55,0	5,7	10,6	5,9	29,3	5,7
	1/10				1/25			
Testicules	23,6	9,0	43,3	5,0	7,6	3,4	15,8	3,1
Plasma	20,0	7,2	41,5	7,3	11,6	1,0	23,3	2,7
	1/10.000				1/20.000			
Reins	9,5	3,3	32,0	5,6	1,6	0,2	9,7	4,5
	1/500				1/1.000			
Cerveau	17,4	2,1	23,0	3,6	7,5	3,9	13,0	2,4

TABLEAU N° VI

PSEUDO-CHOLINESTERASE

Dosages effectués sur 30 Vipères de sexe mâle

Temps d'incutation en heures	2		4		2		4	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/100				1/200			
Œsophage	15,1	2,9	20,9	3,6	6,1	2,2	10,2	2,5
Estomac	25,7	3,4	28,0	4,4	12,3	3,2	20,1	3,9
Colon	7,5	2,9	8,2	2,7	5,1	0,9	6,7	2,1
	1/50				1/100			
Intestin	12,9	3,1	13,3	5,1	7,0	2,2	8,1	4,1
Pancréas	5,8	2,7	6,6	3,4	0,1	0,3	4,7	3,1
Foie	7,6	2,8	15,1	6,2	5,3	1,5	6,9	2,9
Poumons	6,8	4,1	11,2	5,4	5,5	1,7	6,7	2,8
Muscle	6,2	2,5	6,7	3,3	6,5	1,9	6,7	1,9
	1/25				1/50			
Cœur	8,0	3,7	8,1	4,5	4,0	2,5	6,1	2,9
Hématies	12,3	3,8	13,0	4,1	4,1	2,7	5,6	1,8
	1/10				1/25			
Testicules	5,6	1,5	24,1	2,5	5,1	1,3	9,3	2,2
Plasma	17,4	2,4	31,4	2,9	10,3	2,1	16,8	3,4
	1/10.000				1/20.000			
Reins	9,5	1,8	22,7	2,4	1,6	1,5	4,7	1,8
	1/500				1/1.000			
Cerveau	11,4	1,9	11,5	2,0	5,5	1,4	6,7	1,6

TABLEAU N° VII

CHOLINESTERASE VRAIE

Dosages effectués sur les organes de 30 Vipères de sexe mâle

Temps d'incutation en heures	2		4		2		4	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/100				1/200			
Œsophage	10,7	2,7	23,7	3,4	3,2	1,9	11,2	2,9
Estomac	21,7	3,6	46,2	4,2	8,2	2,1	19,5	3,0
Colon	8,1	1,9	15,5	2,7	3,5	2,2	8,0	1,6
	1/50				1/100			
Intestin	4,2	2,1	14,7	2,9	2,2	1,1	7,2	1,3
Pancréas	3,5	1,4	12,6	2,4	4,3	1,8	5,6	0,9
Foie	2,2	0,5	3,7	2,1	1,0	0,4	3,7	0,8
Poumons	1,5	0,3	7,1	1,1	1,0	0,7	4,8	0,9
Muscle	9,1	1,0	20,3	10,2	2,2	2,4	9,2	3,5
	1/25				1/50			
Cœur	4,2	1,9	13,1	2,5	1,6	2,2	7,3	3,0
Hématies	15,0	2,6	42,0	3,4	6,5	2,5	23,7	3,4
	1/10				1/25			
Testicules	8,0	1,7	19,2	1,9	2,5	1,2	6,5	1,5
Plasma	2,6	1,4	10,1	2,1	1,3	1,1	6,5	1,6
	1/10.000				1/20.000			
Reins	0		9,3	2,2	0		5,0	2,1
	1/500				1/1.000			
Cerveau	6,0	1,5	11,5	1,9	2,0	0,9	6,3	1,3

TABLEAU N° VIII

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que :

— les pourcentages d'acétylcholine métabolisée par les homogénats de reins de Rats sont, en 2 heures d'incubation, pour un homogénat dilué au 1/10, pour la cholinestérase totale : 18,1, pour la cholinestérase vraie : 12,8 (BASTIDE) (9).

— ces pourcentages sont de 28,4, avec du plasma de Rat au 1/10 après une incubation de 2 heures pour la *cholinestérase totale* et de 32,6 pour les hématies lysées au 1/10 après un même temps d'incubation. Les résultats obtenus avec les mêmes homogénats, dans les mêmes conditions, sont : pour la *cholinestérase vraie* : pour le plasma : 19,0 ; pour les hématies : 32,2. (BASTIDE) (9).

— dans le foie de la Souris, la pseudo-cholinestérase présente une activité de 28,8 p. 100 en 30 minutes d'incubation pour un homogénat au 1/40. (RIGAL) (80).

CHAPITRE VII

Activités Tranaminasiques G.O.T. et G.P.T.

Aspartate amino-transférase : 2.6.1.1

Alanine amino-transférase : 2.6.1.2

La réaction de transamination enzymatique fut découverte en 1937 par BRAUNSTEIN et KRITZMANN (23) dans le muscle de pigeon. Les enzymes responsables ont été nommées *transaminases* ou *aminophérases*. Une *transaminase* ou *aminophérase*, catalyse le transfert du groupe $-NH_2$ d'un acide aminé sur un acide cétonique :

acide α-cétoglutarique + acide aminé ⟶ acide glutamique + acide α-cétonique.

Selon l'acide aminé qui réagit, on appelle l'enzyme *alanine-céto-glutarate-transaminase*, ou *valine-céto-glutarate-transaminase*.

Les acides aminés qui sont le plus souvent transaminés par l'acide α-céto-glutarique sont l'acide aspartique, l'alanine, la leucine, l'iso-leucine, la valine. On a aussi découvert certaines *transaminases*, plus rares, catalysant des réactions dans lesquelles l'acide α-céto-glutarique est remplacé par un autre acide cétonique ; plusieurs réactions ont ainsi été décrites dans les tissus animaux et chez les bactéries avec l'acide pyruvique et divers acides aminés comme la sérine, la leucine, la valine. La réaction de transamination est à proprement parler une réaction d'oxydo-réduction interne, puisqu'il s'agit d'un transfert d'électrons au sein de la base de Schiff.

Les activités *transaminasiques glutamique-oxalacétique* et *glutamique-pyruvique* correspondant aux réactions suivantes :

α-cétoglutarate + L aspartate $\xrightarrow{\text{G.O.T.}}$ glutamate + oxalacétate

α-cétoglutarate + L alanine $\xrightarrow{\text{G.P.T.}}$ glutamate + pyruvate.

Chez la Vipère, nous avons dosé les activités *glutamique-oxalacétique-transaminasique* et *glutamique-pyruvique-transaminasique* selon la méthode de REITMAN et FRANKEL (79) modifiée par DASTUGUE, BAUDON, BASTIDE et CARCASSIN (35). La technique de FRANKEL et REITMAN (79) mesure le taux d'oxalacétate ou de pyruvate formé en trente minutes ou en une heure par appréciation photocolorimétrique de leurs hydrazones.

Réactifs :

— Solution de tampon phosphate 0,1 M de pH = 7,4 :

420 ml de phosphate disodique 0,1 M (35,81 g/l) ;

80 ml de phosphate monopotassique 0,1 M (13,7 g/l) ;

— Solution étalon de pyruvate de sodium à 22 mg dans 100 ml de tampon phosphate.

— Solution de substrat G.O.T. :

α-cétoglutarate 2 mM/l ;

dL aspartate 200 mM/l ;

mettre 29,2 mg d'acide α-cétoglutarique et 2,66 g d'acide dL-aspartique dans un petit mortier ; ajouter NaOH N jusqu'à dissolution totale (15 ml) ; ajuster avec NaOH à pH = 7,4 ; transvaser dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter avec le tampon.

— Solution de substrat G.P.T. :

α-cétoglutarate 2 mM/l ;

dL-alanine 200 mM/l ;

mettre dans un mortier 29,2 mg d'acide α-cétoglutarique et 1,78 g d'alanine. Ajuster le pH à 7,4. Transvaser dans un ballon jaugé de 100 ml ; compléter à 100 ml avec la solution de tampon phosphate. Conserver à — 25° C en flacons plastiques.

— Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 19,8 mg pour 100 ml, dans HCl. Conserver à + 4° C en flacons colorés.

— Solution de soude 0,4 N.

— Solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 dans l'eau distillée.

Mode opératoire :

Laisser en contact une demi-heure et une heure au bain-marie à 37° C :

1 ml de substrat G.O.T. (ou G.P.T.) ;

1 ml de tampon phosphate ;

0,2 ml de préparation enzymatique ;

La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de la solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine. Laisser reposer 20 minutes ; ajouter ensuite 9 ml de soude 0,4 N ; agiter.

Après 30 minutes de repos, apprécier la coloration obtenue au photocolorimètre sur 505 mμ.

Gamme étalon :

Introduire dans onze tubes 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 0,10 ml de la solution de pyruvate étalon (correspondant à 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 p. 100 d'hydrolyse enzymatique), puis 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0 ml de substrat G.O.T. ou G.P.T. pour la gamme étalon de chaque enzyme ; enfin 1 ml de solution de tampon phosphate et 0,2 ml d'eau distillée. Opérer ensuite comme il est indiqué plus haut, mais sans incubation.

Témoins :

Pour chaque série de dosages, préparer deux tubes témoins : l'un mis à incuber et renfermant tous les réactifs (sauf la préparation enzymatique qui est remplacée par une quantité équivalente d'eau distillée), l'autre non incubé et renfermant tous les réactifs.

Résultats :

Les résultats expérimentaux permettent de signaler une richesse enzymatique d'intensité différente, dans les différents organes de *Vipera aspis*, pour les deux *transaminases* G.O.T. et G.P.T. Ainsi, pour la G.O.T., la richesse enzymatique suivant les organes est (en ordre décroissant) : muscle cardiaque, foie, reins et muscle dorsal, pancréas et testicules. Pour la G.P.T., la teneur enzymatique va en décroissant des reins, pancréas, tube digestif, cœur, poumons, aux testicules et muscle dorsal.

Par exemple, on relève pour la G.O.T. au 1/250 en 60 minutes 13 p. 100 d'activité enzymatique dans l'estomac, 10 p. 100 dans l'intestin, 9 p. 100 dans le colon et 8 p. 100 dans l'œsophage. Pour la G.P.T., on note : au 1/50, en 60 minutes d'incubation, 35 p. 100 de substrat métabolisé par l'homogénat d'estomac, 18 p. 100 par l'homogénat d'intestin, 13 p. 100 par l'homogénat d'œsophage et 8 p. 100 par l'homogénat de colon.

Enfin, il est à noter que non seulement le plasma, mais également les hématies, présentent des activités transaminasiques faibles.

Pourcentages moyens d'activité *transaminasique* G.O.T.
dans les organes et humeurs de *Vipera aspis*

Temps d'incubation en minutes	30		60		30		60		30		60	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
Dilutions	1/100				1/250				1/500			
Reins	21,3	2,4	30,6	5,1	11,8	2,1	19,6	2,3	6,5	1,4	12,0	2,1
Foie	29,8	2,5	44,3	6,2	17,5	2,5	28,5	4,5	11,5	2,5	17,3	1,9
Cœur	31,6	2,9	46,3	6,5	19,2	3,1	30,5	3,9	11,8	3,1	20,7	2,3
Poumons	8,0	4,0	12,7	2,7	5,7	0,9	7,7	1,5	3,8	0,9	5,6	1,7
Pancréas	14,1	3,1	23,2	4,3	6,7	1,1	10,5	2,2	3,7	1,2	6,3	1,8
Testicules	6,7	1,9	12,0	1,8	4,0	1,4	5,5	1,9	2,6	2,1	4,8	1,2
Muscle dorsal	19,3	1,7	31,0	3,5	11,1	2,3	18,0	2,3	5,5	3,0	10,7	2,5
Œsophage	8,6	2,1	14,1	2,6	4,7	0,9	8,0	1,4	3,8	1,8	4,8	2,1
Estomac	13,6	1,8	23,0	3,2	7,1	1,5	13,2	2,5	5,1	2,2	8,1	2,2
Intestin	13,8	2,4	22,0	4,2	6,8	1,7	10,8	3,2	5,3	1,7	6,0	3,2
Colon	9,6	2,2	18,5	1,5	4,8	2,1	9,1	1,7	3,2	1,6	6,3	3,7
	Non dilué				Dilué au 1/2							
Plasma	3,0	0,9	4,2	1,2	1,6	0,5	2,2	0,9				
	1/5				1/10				1/25			
Hématies	29,0	2,7	39,0	3,4	21,0	2,8	28,7	3,1	14,3	2,1	18,7	2,5

TABLEAU N° IX

Pourcentages moyens d'activité *transaminasique* G.P.T.
dans les organes et humeurs de *Vipera aspis*

Temps d'incubation en minutes	30		60		30		60		30		60	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
Dilutions	1/25				1/50				1/100			
Reins					80,0	10,2	80,0	9,7	52,3	5,2	66,0	4,9
Foie	21,0	4,2	29,3	2,7	13,0	2,5	18,0	2,5	6,6	1,3	11,5	4,1
Cœur	7,0	2,1	8,0	1,9	4,7	1,5	7,0	1,6	2,0	1,5	2,5	1,5
Poumons	11,3	2,5	13,0	3,4	5,5	2,1	6,0	1,4	2,1	1,6	3,0	0,9
Pancréas	47,5	5,4	60,0	8,1	28,0	3,4	38,3	4,2	9,0	2,0	14,8	2,2
Testicules	11,5	3,4	14,1	2,5	3,7	1,2	5,0	1,1	0,8	0,1	1,3	0,8
Muscle dorsal	9,3	2,3	11,8	5,3	4,2	1,6	4,5	2,3	1,8	0,9	3,1	2,3
Œsophage	20,3	4,3	32,0	6,2	9,0	2,0	13,5	3,5	1,7	0,7	2,5	1,3
Estomac	51,3	7,2	58,8	7,5	23,6	3,7	35,6	5,2	6,3	2,2	10,6	4,2
Intestin	30,0	5,2	41,7	4,3	12,0	2,2	17,5	1,9	3,1	1,4	6,1	2,5
Colon	18,8	1,5	21,0	2,2	7,7	1,3	8,5	2,1	1,5	1,2	3,5	1,1
	Non dilué				Dilué au 1/2							
Plasma	1,0	0,8	2,0	0,9	0		0					
	1/5				1/10				1/25			
Hématies	26,5	1,7	38,5	3,1	13,6	2,1	24,7	3,2	6,0	2,2	11,2	4,1

TABLEAU N° X

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que :

Pour les transaminases, le foie de Souris, dilué au 1/500 et après une incubation de 30 minutes présente une activité G.O.T. de 12,2 p. 100, et une activité G.P.T. de 23,3 p. 100 (RIGAL) (80).

L'activité transaminasique G.O.T. du rein de Souris, après 30 minutes d'incubation et pour une dilution de l'homogénat au 1/80 est de 26,5 p. 100. L'activité transaminasique G.P.T. de cet organe dilué au 1/40 après 30 minutes d'incubation est de 21,8 p. 100 (BASTIDE) (9).

CHAPITRE VIII

Activités Phosphatasiques

Phosphatase alcaline : 3.1.3.1
Phosphatase acide : 3.1.3.2

Les *phosphatases* sont des hydrolases qui catalysent la scission du substrat, avec fixation des éléments de l'eau sur les produits de la réaction. Elles agissent sur les liaisons ester-phosphoriques, ainsi que sur les liaisons anhydrides phosphoriques. Elles séparent l'acide orthophosphorique libre ou à l'état de monoester, à partir des dérivés phosphorés minéraux.

Les *phosphatases* furent parmi les dernières hydrolases à être mises en évidence ; ce n'est qu'en 1906 que SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI décelèrent pour la première fois avec certitude une activité phosphatasique dans le son de blé.

On distingue deux sortes de *phosphatases :*

— les *phosphatases* scindant une liaison entre deux atomes de phosphore : c'est le cas des *pyrophosphatases* et des *polyphosphatases.*

— les *phosphatases* scindant une liaison entre un atome de phosphore et un radical organique : c'est le cas des *phosphamidases, phosphomonoestérases* (*F*-1-6 *di-phosphatase, G*-6- *phosphatase, nucléotidase*), *phosphodiestérases, aldose*-1- *phosphatases, acylphosphatases.*

La recherche et le dosage des *phosphatases* sont des opérations courantes. Le substrat utilisé pour ces dosages est le para-nitrophényl-phosphate de soude. Il convient de réaliser parallèlement un témoin indiquant la proportion d'orthophosphate initialement présent dans l'échantillon à doser.

La *phosphatase alcaline,* qui est une *phosphomonoestérase,* a un pH optimum de 8,0 - 9,0. C'est la *phosphatase* la plus répandue dans les tissus animaux, en particulier dans la muqueuse intestinale, le cortex rénal, le foie, les leucocytes. Elle est décelable en quantités moins importantes dans les hématies, les plaquettes sanguines, le plasma, le cerveau.

La *phosphomonoestérase II* ou *phosphatase acide* possède un pH optimum de 5,0 - 5,6. Chez les mammifères, elle a été décelée dans le foie, la rate, les reins, le muscle, le cerveau, le pancréas. Mais dans ces organes, l'activité est bien moins importante que celle de la *phosphatase alcaline.*

Le dosage des activités phosphatasiques acide et alcaline dans les divers organes et humeurs de *Vipera aspis* a été effectué selon la méthode de BESSEY (16) qui consiste à doser le paranitrophénol libéré à partir du paranitrophénol phosphate par action des *phosphatases* à 37° C. Selon le pH du milieu d'incubation, on apprécie l'activité *phosphatasique alcaline* ou *acide.* La réaction est :

Paranitrophényl phosphate + H_2O ⟶ paranitrophénol + PO_4H_3.

Réactifs :

— Solution de paranitrophényl phosphate de soude M/1.000 (P.M. = 263). préparée extemporanément.

— Solution de paranitrophénol M/2.000.

— Tampon glycocolle - soude de pH = 10,5 :

solution A :

Glycocolle		7,505 g
NaCl		5,85 g
Alcool à 80°		20 ml
Eau distillée	q.s.p.	100 ml

solution B : NaOH 0,1 N.

Mélanger extemporanément : 45 ml de solution B ; 55 ml de solution A.

— Tampon citrique de pH = 4,8 :

Acide citrique		21,008 g
NaOH N		200 ml
Eau distillée	q.s.p.	1.000 ml

— Soude 0,02 N.

— Soude 0,2 N.

Mode opératoire :

a) *Phosphatase alcaline :* Faire incuber à 37° C : 1 ml du mélange à parties égales de tampon glycocolle-soude et de substrat M/1.000, avec 0,1 ml d'enzyme. Après 30 et 60 minutes d'incubation, ajouter 10 ml de NaOH 0,02 N et lire au spectrophotomètre à 410 mμ.

b) *Phosphatase acide :* après une incubation à 37° C de 30 et 60 minutes de 0,1 ml d'enzyme avec 1 ml du mélange à parties égales de tampon citrique de pH = 4,8 et de substrat M/1.000, la réaction est stoppée et la coloration développée par addition de 10 ml de NaOH 0,2 N. On lit au spectrophotomètre à 410 mμ.

Etalonnage :

Les résultats sont comparés à une gamme étalon obtenue avec une série de tubes contenant 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 ml de solution de paranitrophénol M/2.000 et 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ml d'eau distillée. Ajouter 10 ml de NaOH 0,02 N et lire au spectrophotomètre à 410 mμ.

Pourcentages moyens d'activité *phosphatasique acide* dans les organes et humeurs de *Vipera aspis* (20 Vipères mâles)

Temps d'incubation minutes	30		60		30		60	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
Dilutions	1/50				1/100			
Reins	79,5	7,2	80,7	8,5	77,6	5,4	80,2	6,9
Foie					17,0	2,4	24,3	2,7
Cœur	8,3	2,1	14,5	2,2	2,8	1,3	7,8	3,2
Poumons	7,1	1,7	12,8	3,1	2,6	1,7	6,3	2,1
Pancréas	16,7	3,2	23,5	3,4	5,6	2,1	12,1	4,3
Testicules	9,1	1,8	15,5	1.9	2,8	1,2	6,5	1,4
Muscal dorsal	9,2	2,1	15,9	2,3	5,5	1,5	7,6	1,8
Œsophage	5,7	1,5	11,8	1,7	2,5	1,6	6,0	1,9
Estomac	10,3	3,2	14,1	1,5	3,8	2,0	9,8	1,5
Intestin	15,5	2,7	26,7	2,7	7,7	3,1	12,3	2,4
Colon	11,7	2,4	19,0	2,2	4,7	1,3	9,5	1,7
Hématies	17,7	3,1	27,5	4,3	5,8	1,9	10,0	5,2
	(non dilué)				(dilué au 1/2)			
Plasma	0,7	0,2	3,0	0,8	0,3	0,09	0,7	0,08

TABLEAU N° XI

Pourcentages moyens d'activité *phosphatasique alcaline* dans les organes et humeurs de *Vipera aspis* (20 Vipères mâles)

Tissus	Dilutions	Temps d'incubation (Minutes) 30		60	
		M	σ	M	σ
Reins	1/250	10,7	2,5	10,8	1,8
Foie		17,1	2,8	21,1	3,2
Cœur		9,5	1,9	13,5	2,4
Poumons		3,5	2,1	5,0	1,7
Pancréas	1/25	17,5	3,4	22,2	3,2
Testicules		19,6	5,8	26,2	4,5
Muscle dorsal		1,8	0,9	2,5	1,3
Œsophage		8,6	2,1	8,8	2,3
Estomac		4,5	1,7	5,5	1,9
Intestin		15,7	4,3	17,8	3,5
Colon		8,2	1,5	12,0	2,8
Plasma	1/2	10,0	2,6	13,8	3,4
Hématies	1/50	6,0	2,1	7,0	1,6

TABLEAU N° XII

Nous relevons une activité élevée pour la *phosphatase acide* au niveau du rein et des hématies, ainsi que pour la *phosphatase alcaline* au niveau du foie.

L'activité *phosphatasique acide* est très faible au niveau du plasma ; au contraire, ce dernier présente une activité *phosphatasique alcaline* non négligeable.

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que :

— dans le foie de Souris dilué au 1/80, l'activité de la *phosphatase acide,* après une incubation de 30 minutes, se révèle de 23,8 p. 100 ; celle de la *phosphatase alcaline,* dans un homogénat au 1/40 et après incubation de 30 minutes est de 31,3 p. 100 (RIGAL) (80).

— dans les ovaires de la Ratte, on détecte une activité *phosphatasique acide* de 10,3, au 1/500, après incubation de 30 minutes ; dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité *phosphatasique alcaline* pour un même homogénat est de 7,6 p. 100, (PLAZONNET) (78).

— dans les homogénats d'intestin grêle d'Agneau, nous relevons pour la *phosphatase acide,* avec un homogénat d'organe au 1/50 et une durée de l'incubation de 30 minutes, une activité de 20,1 p. 100 pour le duodénum, 22,3 p. 100 pour le jéjunum et 16,2 p. 100 pour l'iléon.

Les résultats obtenus pour la *phosphatase alcaline* pour une incubation de 30 minutes et une dilution des homogénats au 1/100, respectivement, sont de : 29,1, 38,2, 5,1 p. 100. (TOURNAIRE et coll.) (91).

CHAPITRE IX

Activité 5-Nucléotidasique

(3.1.3.5.)

La 5-*nucléotidase* est une *phosphomonoestérase* à spécificité particulière, agissant sur les 5' nucléotides et n'hydrolysant que lentement les autres dérivés phosphorés.

NIKOL'SKAYA (74) en 1964, indiquait une méthode permettant la séparation de la 5'*nucléotidase* à partir du venin de *Vipera lebetina*. En 1965, le même auteur (75) réalisait le dosage de l'enzyme dans le venin de *Vipera lebetina*.

Nous en avons effectué le dosage selon la méthode de CAMPBELL (26) modifiée par BASTIDE, BALLADE et DASTUGUE (12).

La 5-*nucléotidase* catalyse la déphosphorylation des nucléotides qui ont le groupe phosphate attaché au C_5 du radical ribose. L'activité est maximum à pH = 7,5 ; à ce pH se produit une hydrolyse significative du substrat par la *phosphatase alcaline* non spécifique pour laquelle une correction doit être faite. La méthode comprend la détermination simultanée des deux activités enzymatiques avec l'adénosine-5-phosphate comme substrat. Une des déterminations se fait en présence de nickel qui inhibe spécifiquement la 5-*nucléotidase* et donne donc l'activité de la seule *phosphatase alcaline* non spécifique ; l'autre détermination, sans nickel, fournit la somme des activités des deux enzymes. Par soustraction, on obtient la 5-*nucléotidase* seule.

Réactifs :

— Sulfate de manganèse 0,020 M (P.M. = 169,01), soit 3,3802 g/l.

— Tampon barbital 0,04 M ; ajuster à pH 7,5 avec HCl ; soit 8,248 g/l.

— Substrat : AMP 10 mM (PM du sel disodique à 6 H_2O = 499), soit 0,0499 g/10 ml ; stable une semaine.

— Chlorure de nickel 0,1 M (PM = 238), soit 2,38 g/100 ml.

— Acide trichloracétique à 10 p. 100.

— Réactif de Fiske :

Acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique	.....	0,2 g
Métabisulfite de sodium	.....	12 g
Sulfite anhydre de sodium	.....	1,2 g
Eau distillée	..... q.s.p.	100 ml

passer au broyeur pour obtenir une suspension fine.

— Molybdate d'ammonium :

Molybdate d'ammonium	.....	5 g
Acide sulfurique conc. (d = 1,83) 14,7 g, soit 8 ml environ.		
Eau distillée	..... q.s.p.	100 ml

Technique :

Dans deux séries de tubes à hémolyse on met successivement :

	A	B
Préparation enzymatique	0,2 ml	0,2 ml
Sulfate de manganèse 20 mM	0,1 ml	0,1 ml
Chlorure de nickel	0 ml	0,2 ml
Tampon barbital	1,5 ml	1,3 ml
AMP	0,2 ml	0,2 ml

Mettre au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.

Ajouter 2 ml d'acide trichloracétique dans chacun des tubes ; agiter ; centrifuger.

Prélever 2 ml de surnageant et doser le phosphore selon la méthode de Fiske et Subbarow :

A chaque prise d'essai, ajouter 1 ml de molybdate d'ammonium en milieu sulfurique, puis 4 ml d'eau, 0,5 ml de réactif de Fiske et de l'eau distillée q.s.p. 10 ml. Laisser reposer 5 minutes et lire au photocolorimètre à 650 mμ.

L'activité 5-*nucléotidasique* correspond à la différence entre les tubes A et les tubes B.

La gamme étalon est obtenue à l'aide d'une solution de PO_4H_2K à 0,0005 M/l (P.M. = 136,09), soit 6,8 mg pour 100 ml.

On met dans une série de onze tubes :

0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0 ml de solution de PO_4H_2K, et on complète à 2 ml avec de l'eau distillée, dans chaque tube. On colore comme le surnageant par la méthode de Fiske et Subarrow.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de substrat métabolisé dans un temps donné. Ils sont rassemblés dans le tableau n° XIII. Nous notons une forte activité 5-*nucléotidasique* au niveau des reins, ainsi qu'au niveau des poumons, du cœur, du colon, des testicules. Par contre, l'activité est très faible au niveau du foie, du pancréas, de l'estomac et de l'intestin.

Pourcentages moyens d'activité 5-nucléotidasique de divers organes et humeurs de *Vipera aspis* (Dosages effectués sur 15 Vipères de sexe mâle)

Temps d'incubation	15'		30'		15'		30'		15'		30'	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/25				1/50				1/100			
Poumons	25,9	6,1	40,9	4,9	14,9	2,9	21,0	2,2	3,0	0,5	12,7	2,7
Cœur	39,3	3,2	55,4	7,1	21,9	3,2	33,3	4,5	8,6	0,9	18,9	4,3
Foie	0,9	0,4	6,3	2,5								
Pancréas	6,2	2,1	8,5	2,2	0,1	0,09	4,6	1,2				
Œsophage	15,3	3,2	25,7	3,4	4,3	0,7	14,7	3,4	2,9	1,2	4,4	2,1
Estomac	3,2	1,7	8,4	1,8	2,3	1,1	4,9	0,9				
Intestin	7,5	1,9	0,6	0,9	3,1	2,1	0,6	0,1				
Colon	23,5	2,7	26,7	2,3	7,3	2,5	9,7	1,7	0,6	0,1	4,5	0,9
Muscle	16,2	2,4	12,0	1,9	1,6	1,2	3,1	1,1				
Testicules	20,6	2,6	26,4	3,4	11,0	3,2	12,2	2,1	1,4	1,0		
Cerveau	4,8	1,5	4,9	1,2							6,2	1,2
Hématies	11,2	1,9	11,4	3,2	0,0		2,7	0,9				
	1/100				1/250				1/500			
Reins	22,3	2,8	32,7	5,8	18,9	3,4	29,6	2,8	0		0	

TABLEAU N° XIII

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que :

— L'activité 5-nucléotidasique du foie de Souris homogénéisé au 1/50, après 30 minutes d'incubation, est de 13,6 p. 100 (RIGAL) (80).

— L'activité 5-nucléotidasique d'homogénats de reins de Rats au 1/100 après incubation de 30 minutes est de 30,2 p. 100. (BASTIDE) (9).

— L'activité 5-nucléotidasique des hématies de Rats lysées au 1/10 après une incubation de 24 heures est de 5,1 p. 100. (BASTIDE) (9).

— L'activité 5-nucléotidasique de l'hépatopancréas d'*Helix pomatia* après une heure d'incubation et pour une dilution au 1/50 s'avère de 10 p. 100. (BASTIDE, BALLADE et DASTUGUE) (12).

CHAPITRE X

Activités β-Glucuronidasique

(3.2.1.31.)

La β-*glucuronidase* est une enzyme qui hydrolyse les osides de l'acide glucuronique. Cette enzyme fut décelée en 1905 par NEUBERG et NIEMAN (73) dans l'émulsine des amandes. Cette enzyme est de nature protéique et hydrosoluble.

Chez les mammifères, l'acide glucuronique fait partie de la molécule de nombreux polysaccharides : héparine, acide hyaluronique... Il n'est donc pas surprenant que la β-*glucuronidase* soit une enzyme fort répandue. Elle a été décelée dans diverses bactéries et en particulier dans *E.Coli* ; elle est assez rare chez les champignons et n'a été signalée que rarement chez les végétaux supérieurs.

GOSLAR en 1964 (49), dans la couche des cellules basales de la peau chez *Natrix natrix,* trouve une forte activité β-*glucuronidasique.*

Dans onze organes, dans le plasma et les hématies, nous avons dosé l'activité β-*glucuronidasique* chez la Vipère, selon la méthode de TALALAY, FISHMAN et HUGGINS (89).

A pH = 4,5, on fait agir à 37° C la préparation enzymatique sur le phénolphtaléine-glucuronide (P.P.G.). La phénolphtaléine libérée quantitativement est dosée photocolorimétriquement à pH = 10,45.

Pourcentages moyens d'activité β-*glucuronidasique*
dans les organes et humeurs de *Vipera aspis*
(Dosages effectués sur les organes de 15 Vipères de sexe mâle)

Temps d'incubation (heures)	1		2	
	M	σ	M	σ
Dilutions	1/100			
Reins	15,2	2,3	23,5	3,4
Foie	31,5	5,2	53,7	6,2
Cœur	3,0	1,9	5,1	2,2
Poumons	6,3	1,7	9,2	2,3
Pancréas	9,0	2,1	12,5	2,7
Testicules	24,3	3,4	46,0	4,1
Muscle dorsal	2,3	0,9	3,5	1,4
Œsophage	4,7	1,4	7,7	1,9
Estomac	4,7	1,6	7,1	2,1
Intestin	12,0	2,7	26,0	2,9
Colon	11,2	2,2	18,0	2,6
	1/25			
Plasma	15,5	3,2	27,7	4,3
	1/25			
Hématies	2,0	1,2	5,0	1,9

TABLEAU N° XIV

Les résultats obtenus témoignent d'une importante activité β-*glucuronidasique* au niveau du foie et des testicules, d'une activité modérée au niveau des reins, de l'intestin et du colon, et d'une faible activité dans les autres organes.

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que :

— L'activité β-glucuronidasique du rein de Souris homogénéisé au 1/40 après une incubation de une heure est de 27 p. 100 ; le rein de Rat, dans les mêmes conditions, présente une activité de 38,5 p. 100. (BASTIDE) (9).

— L'activité β-glucuronidasique dans les ovaires de Rattes pubères après une incubation d'une heure et une dilution de l'homogénat au 1/250 est de 23,2 p. 100 (PLAZONNET) (78).

— L'activité β-glucuronidasique du suc hépato-pancréatique d'*Hélix pomatia* se révèle de 58 p. 100 en une heure d'incubation, après dilution au 1/1.000. (CHAMBON) (27).

Réactifs :

— Solution de P.P.G. (mono-β-glucuronide de la phénolphtaléine) à 0,0005 M dans l'eau distillée (12,35 mg/50 ml), à préparer extemporanément.

— Tampon acéto-acétique : 0,1 M de pH = 4,5.

— Tampon glycocolle : 0,4 M de pH = 10,45 :

solution A :

Glycocolle		7,505 g
NaCl R.P.		5,850 g
Alcool à 80°		20 ml
Eau distillée	q.s.p.	100 ml

solution B : soude N/10.

Ajouter extemporanément 560 ml de solution A et 440 ml de solution B.

— Acide trichloracétique N/2 (81,75 g/l).

— Soude N/2.

Mode opératoire :

Introduire dans un tube à centrifuger :

Tampon acéto-acétique	2 ml
P.P.G.	1 ml
Enzyme	1 ml

Incuber à 37,5° C une heure et deux heures. Verser ensuite dans chaque tube 2 ml d'acide trichloracétique, centrifuger. Prélever 3 ml de surnageant ; ajouter 1 ml de solution de soude N/2 et compléter à 10 ml avec le tampon glycocolle.

Apprécier le pourcentage de scission enzymatique au photocolorimètre à 550 mμ.

Etalonnage :

L'étalonnage se fait à l'aide d'une solution de phénolphtaléine 0,0005 M dans l'alcool à 80°. Dans une série de tubes, on introduit : 0, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50 ml de solution de phénolphtaléine qui correspond à 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 p. 100 de scission enzymatique.

CHAPITRE XI

Activité Leucine-Amino-Peptidasique

(3.4.1.1.)

La *leucine-amino-peptidase* est une exopeptidase qui réalise la dégradation par voie hydrolytique des molécules polypeptidiques, pour les amener à l'état de molécules plus petites, directement utilisables par l'organisme. La *leucine-amino-peptidase* scinde les liaisons aux extrémités de la chaîne polypeptidique. C'est une enzyme que l'on rencontre dans le règne végétal et dans le règne animal. Elle a été découverte par LINDERSTROM-LANG en 1929 (62).

L'enzyme se comporte comme une protéine de poids moléculaire élevé ; son maximum de stabilité se situe entre pH = 8 et pH = 8,5. Sa spécificité a été étudiée par SMITH et SPACKMAN (85) : l'enzyme hydrolyse les peptides à groupement -NH_2 terminal libre, mais dont le carboxyle n'est pas nécessairement libre. La *leucine-amino-peptidase* est non seulement capable d'attaquer de petits peptides, mais encore des polypeptides et des protéines.

In vitro, cette enzyme catalyse la réaction suivante :

L-Leucyl-β-Naphtylamide + H_2O ⟶ Leucine + β-Naphtylamide.

Nous avons apprécié l'activité *leucine-amino-peptidasique* selon la technique de GOLDBARG et RUTENBURG (48) légèrement modifiée. La quantité de β-naphtylamine produite, proportionnelle à l'activité de la L.A.P., réagit avec une base colorée, la N-naphtyl-éthylène-diamine, pour former une coloration pourpre, que l'on évalue par photocolorimétrie à 560 mμ.

Réactifs :

— Tampon phosphate 0,2 M à pH = 7,0 :

Solution A : PO_4H_2K sec : 27,4 g p. 1.000 ;

Solution B : PO_4H_2Na, 12 H_2O : 71,6 g p. 1.000.

Mélanger 40 ml de solution A et 60 ml de solution B.

— L-Leucyl-β-naphtylamide, HCl 0,0003425 M (P.M. = 292,7),
en préparer 0,2 mg/ml d'eau et mélanger à volume égal dans le tampon phosphate 0,2 M à pH = 7,1. Placer au congélateur à — 25°C en flacons plastiques.

— Solution aqueuse de nitrine de soude à 0,1 p. 100 dans l'eau glacée ; à préparer extemporanément.

— Solution de N-naphtyléthylène diamine, 2 HCl, à 0,05 p. 100 dans l'éthanol à 95°C. Conserver à + 4°C en flacons colorés.

— Solution d'acide trichloracétique à 15 p. 100 dans l'eau.

— Solution de β-naphtylamine à 0,0003425 M (P.M. = 143,2).

Faire une solution mère : 49,046 mg de naphtylamine, 50 ml d'éthanol, q.s.p. 100 ml d'eau.

Pour l'emploi diluer cette solution au 1/10, soit 4,90 mg p. 100.

Mode opératoire :

Incuber au bain-marie à 37°C pendant 30 et 60 minutes :

a) essai :
1 ml de préparation enzymatique ;
1 ml de solution de substrat.

b) témoins : Hydrolyse spontanée :
1 ml d'eau distillée ;
1 ml de solution de substrat.

Témoin 100, pour régler le photocolorimètre :
1 ml de tampon phosphate ;
1 ml d'eau distillée.

Témoin de coloration (afin de déceler la présence de substances diazotables dans la préparation enzymatique) :
1 ml de tampon phosphate ;
1 ml de préparation enzymatique.

En fin d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml d'acide trichloracétique à 15 p. 100. Agiter doucement ; centrifuger. Prélever :
1 ml de surnageant dans des tubes secs. Ajouter :
1 ml de solution de nitrite de sodium. Agiter. Repos 3 mn.
1 ml de sulfamate d'ammonium. Agiter. Repos 2 mn.
2 ml de solution alcoolique de N-naphtyl-éthylène-diamine.
Agiter ; repos 20 mn.

La lecture se fait alors au photocolorimètre à 560 mμ.

Etalonnage :

La courbe d'étalonnage est obtenue en employant des quantités connues et croissantes de naphtylamine à 4,89 g p. 100. Introduire dans onze tubes : 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 ml de cette solution, puis 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0 ml d'eau distillée, 1 ml de tampon phosphate à pH = 7, et 1 ml d'acide trichloracétique à 15 p. 100. On effectue ensuite la réaction de coloration décrite ci-dessus pour obtenir une gamme correspondant à 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 p. 100 d'hydrolyse.

Pourcentages moyens d'activité *leucine-amino-peptidasique*
dans les organes et humeurs de *Vipera aspis*

Temps d'incubation en minutes	30		60		30		60		30		60		30		60	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
Dilutions	1/500				1/1.000				1/2.500				1/5.000			
Reins	36,3	3,7	73,3	7,4	20,6	2,3	35,7	3,4	8,5	1,9	17,6	3,4	3,1	1,3	10,8	1,6
Foie	34,2	4,8	72,3	6,9	16,5	2,1	33,2	4,8	5,8	1,5	14,3	2,5	1,6	0,8	6,1	0,9
Cœur	13,7	2,5	30,5	4,3	5,2	0,7	13,7	2,7	2,3	0,7	5,6	0,9	1,0	0,4	3,6	1,7
Poumons	17,8	2,7	42,5	5,2	8,1	1,1	19,2	2,8	3,6	2,1	8,0	1,4	1,6	0,6	4,5	1,1
Pancréas	21,0	3,2	44,2	5,6	11,3	1,7	22,5	3,1	3,7	1,5	9,0	1,6	2,2	1,1	5,5	1,3
Testicules	26,0	3,4	55,0	7,1	12,5	2,4	26,0	2,2	3,5	1,3	11,0	2,8	2,2	0,9	5,5	1,4
Muscle dorsal	14,6	1,9	29,1	3,4	5,8	1,5	16,2	1,9	2,8	1,1	6,0	1,8	1,8	0,8	3,1	0,9
Œsophage	20,3	2,5	36,5	4,3	8,8	3,2	19,1	1,8	2,6	1,0	7,3	2,1	1,6	1,2	4,0	1,2
Estomac	22,3	3,4	42,7	4,5	11,3	3,4	20,8	2,0	3,3	2,2	6,6	1,2	1,6	0,7	4,3	1,7
Intestin	100,0	11,2	100,0	12,2	88,0	11,7	100,0	10,9	34,5	5,3	61,5	7,4	17,0	2,4	32,5	4,4
Colon	90,0	9,8	100,0	13,4	58,0	5,8	85,0	11,2	22,5	3,2	38,0	3,5	11,5	3,1	22,0	3,2
	1/25				1/50				1/100				1/250			
Plasma	28,8	2,7	49,8	9,5	17,3	3,5	30,1	5,2	7,7	2,5	14,5	2,7	3,0	1,5	6,2	1,7
Hématies	85,0	8,4	100,0	11,3	44,2	4,5	85,0	8,7	23,5	3,2	46,5	5,5	7,0	1,9	14,0	2,0

TABLEAU N° XV

Résultats :

Les résultats expérimentaux témoignent d'une importante activité *leucine-amino-peptidasique.*

Au niveau du rein et du foie, nous observons une forte activité atteignant respectivement 35 et 33 p. 100 de substrat métabolisé en une heure pour une dilution de l'homogénat au 1/1.000.

Le pancréas et les testicules présentent une activité égale à 22 et 26 p. 100 respectivement, en 1 heure pour une dilution de l'homogénat au 1/1.000.

Pour le tube digestif, l'activité *leucine-amino-peptidasique* est relativement peu élevée dans l'œsophage et l'estomac par rapport à l'activité relevée dans le colon et dans l'intestin où elle atteint 38 p. 100 et 61 p. 100 en une demi-heure et en une heure, pour une dilution de l'homogénat au 1/2.500.

Quant au plasma, il semble beaucoup moins actif, alors que les hématies d'autre part présentent une activité très élevée.

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que l'activité *leucine-amino-peptidasique* exprimée en pourcentage de L-leucyl-β-naphtylamide métabolisé par l'homogénat, est de :

— pour le rein de Souris au 1/1.000 après incubation d'une heure : 71,9.

— pour le rein de Rat au 1/2.500 après incubation d'une heurre : 70,8.

— pour le plasma au 1/20 après incubation d'une heure : 23,6.

— pour les hématies au 1/100 après incubation d'une heure : 58,2. (BASTIDE) (9).

— pour les ovaires de Rattes au 1/1.000 après incubation d'une heure : 34.5. (PLAZONNET) (78).

— pour l'hépatopancréas d'*Hélix pomatia* au 1/1.000 après incubation d'une heure : 28.

— pour le muscle pédieux d'*Helix pomatia* au 1/480, après incubation d'une heure : 17. (BASTIDE, BALLADE et DASTUGUE) (12).

CHAPITRE XII

Activité A.T.P. asique

(3.6.1.3)

L'*adénosine-triphosphatase* ou *A.T.P.ase* est une *phosphatase* à spécificité assez étroite ; elle agit principalement sur l'A.T.P. dont elle détache le radical orthophosphorique situé à l'extrémité de la chaîne. On représente ainsi la réaction *A.T.P.asique :*

$$\text{A.T.P.} + H_2O \longrightarrow \text{A.D.P.} + PO_1H_3$$

La spécificité est cependant moins limitée qu'on ne l'avait cru tout d'abord ; l'enzyme est susceptible de séparer le phosphore terminal de la chaîne polyphosphorique en agissant sur d'autres nucléosides triphosphates.

L'*A.T.P.ase* a été signalée dans divers microorganismes et végétaux ; les *A.T.P.ases* animales sont les mieux connues ; on en trouve dans la rétine, le foie, le cartilage, et essentiellement dans le muscle.

C'est en 1929 que LOHMANN (63) d'une part, FISKE et SUBARROW (44) d'autre part, isolèrent du mulcle l'acide adénosine triphosphorique, corps qui devait par la suite se hisser au tout premier plan des composés biochimiques essentiels.

Principe :

Le dosage de l'activité *A.T.P.asique* est effectué selon la méthode de PERRY (77) qui consiste à estimer photocolorimétriquement le phosphate inorganique libéré par l'enzyme à partir de l'A.T.P. en présence d'ions calcium.

Réactifs :

— Substrats : A.T.P. 0,05 M (sel disodique) à pH = 6,8, soit 0,3115 g pour 10 ml. Cette solution peut être conservée à — 15° C de nombreux mois sans hydrolyse appréciable.

— Tampon glycocolle - soude 0,2 M à pH = 9,1 à 25° C :
solution A : solution de glycocolle 0,2 M (15,01 g/l) ;
solution B : NaOH 0,2 M (8 g/l) exempte de phosphates ;
mélanger 50 ml de solution A et 10,2 ml de solution B, et compléter à 200 ml avec de l'eau distillée. Ajuster à pH = 9,1.

— Chlorure de calcium 0,1 M à 11,1 g/l.

— Acide trichloracétique à 15 p. 100.

— Solution de molybdate acide d'ammonium à 5 p. 100 dans H_2SO_4 3N :
mélanger :

Molybdate d'ammonium		5 g
H_2SO_4 concentré		14,7 g
Eau distillée	q.s.p.	100 ml

— Réactif de Fiske et Subarrow à l'amino-naphtol :

Acide 1-amino, 2-naphtol, 4-sulfonique		0,2 g
Sulfite anhydre de sodium		1,2 g
Métabisultife de sodium		12 g
Eau distillée	q.s.p.	100 ml

Mode opératoire :

Introduire successivement dans des tubes à hémolyse :

Tampon glycocolle 0,2 M	1 ml
Solution de chlorure de calcium	0,2 ml
A.T.P. 0,05 M	0,3 ml
Enzyme	0,5 ml

Porter au bain-marie à 25° C pendant 15 et 30 minutes. La réaction est stoppée par addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 15 p. 100. Centrifuger, prélever 0,33 ml de surnageant, compléter à 1 ml avec de l'eau distillée. Doser le phosphate inorganique par la méthode de FISKE et SUBARROW (44).

Pour cela, ajouter à chaque prise d'essai :

Molybdate d'ammonium en milieu H_2SO_4		1 ml
Eau distillée		3 ml
Réactif de Fiske et Subarrow		0,5 ml
Eau distillée	q.s.p.	100 ml

Lire après 5 minutes au photocolorimètre à 650 mμ.

Gamme étalon :

Pour l'étalonnage, on opère avec une solution de PO_4H_2K à 218 mg par litre.

Pourcentages moyens d'activité *A.T.P.asique*
de divers organes et humeurs de *Vipera aspis*
(Dosages effectués sur 22 mâles)

Temps d'incubation en minutes	15		30		15		30		15		30	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/25				1/50				1/100			
Poumons	17,5	3,4	21,0	1,7	12,5	1,3	17,7	2,1	8,1	1,9	10,6	2,5
Cœur	10,7	3,9	13,8	3,2	5,0	3,7	7,0	1,9	4,5	2,9	6,6	1,7
Foie	22,5	4,1	27,0	4,5	12,3	1,7	17,6	3,6	7,8	1,3	11,2	1,5
Pancréas	16,6	2,9	21,0	4,2	9,9	2,6	13,4	3,1	7,6	2,1	10,3	2,5
Reins	14,4	3,8	19,5	3,2	7,6	4,1	10,6	2,6	5,9	2,0	7,7	1,9
Œsophage	18,7	3,2	22,0	5,0	8,7	3,6	12,3	3,9	7,2	4,1	8,7	2,9
Estomac	9,0	2,7	13,0	3,8	5,2	2,3	7,4	3,0	4,4	1,5	5,9	1,8
Intestin	12,7	2,9	16,2	2,3	6,3	2,4	8,8	1,1	5,8	2,4	6,4	1,6
Colon	11,6	3,4	14,5	3,1	6,3	2,2	9,0	2,8	5,7	1,6	8,8	1,5
Muscle	8,4	3,5	12,1	4,7	6,7	1,6	8,3	4,2	4,5	1,9	5,6	1,9
Testicules	7,0	2,6	8,0	3,9	3,8	1,8	4,5	3,3	2,8	1,4	4,0	3,0
Cerveau	6,6	0,6	10,5	2,3	5,0	1,8	9,1	1,7	4,6	1,5	9,4	1,2
Hématies	30,5	3,1	39,4	4,5	16,2	1,7	20,0	3,4	10,2	1,1	15,5	1,7
	Non dilué				1/2				1/5			
Plasma												

TABLEAU N° XVI

Les résultats, exprimés en pourcentage de substrat métabolisé, indiquent une activité *A.T.P.asique* élevée au niveau du foie et des hématies. Il est à noter que l'activité *A.T.P.asique* du plasma est nulle.

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes, les pourcentages d'adénosine-triphosphate métabolisé sont :

— avec les homogénats de reins de Rats au 1/40 après 15 minutes d'incubation : 47,3.

— avec le plasma non dilué après 15 minutes d'incubation : 24,1.

— avec les hématies lysées au 1/5 après 15 minutes d'incubation : 4,1. (BASTIDE) (9).

— avec le suc digestif d'*Helix pomatia* au 1/50 après incubation d'une heure : 19.

— avec le muscle pédieux d'*Helix pomatia* au 1/30 après une heure d'incubation : 25.

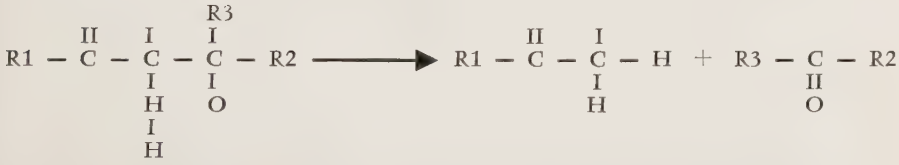
— avec l'hépatopancréas au 1/50 après une incubation d'une heure : 8. (BASTIDE, BALLADE, DASTUGUE) (12).

CHAPITRE XIII

Activité Aldolasique

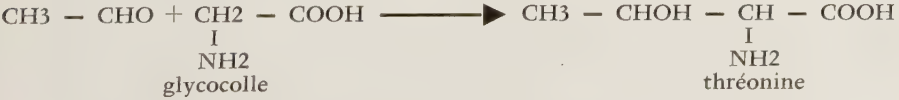
(Fructose-1-6-diphosphate) (4.1.2.13.)

Les aldolases sont des enzymes qui catalysent la réaction suivante :



MEYERHOF et LOHMAN (69) en 1934 découvrirent une zymohexose qui catalysait la réaction d'addition d'une aldéhyde avec la phospho-dihydroxy-acétone. Ils appelèrent ensuite cette enzyme : *aldolase* ; mais la réaction la plus classique catalysée par une *aldolase* est celle qui donne naissance au F-1-6-di-phosphate ou ester de HARDEN et YOUNG, et qui, inversement, scinde cet hexose di-P en deux trioses-phosphates : la phospho-dihydroxy-acétone et la phospho-glycéraldéhyde.

L'*aldolase* semble universellement répandue : le muscle en est particulièrement riche. L'*aldolase* existe aussi dans le plasma sanguin. On a aussi isolé une *aldolase* de la levure, de bactéries, de moisissures. L'*aldolase* la plus répandue combine la phospho-dihydroxyacétone avec la phosphoglycéraldéhyde. Il existe aussi une 1-*P-fructo-aldolase* qui serait présente dans le foie. Cette *aldolase* combine la glycéraldéhyde avec le D et le L érythrose. Le foie et le rein contiennent une enzyme soluble capable d'effectuer la réaction d'aldolisation suivante :



Cette enzyme possède une fonction thiol indispensable et a pour coenzyme le phosphate de pyridoxal.

Chez la Vipère, nous avons effectué les dosages sur les différents organes et humeurs. La technique employée est celle de SIBLEY et coll. (84) reprise par SCHAPIRA (82) et modifiée par DASTUGUE, BASTIDE et coll. (34).

Principe :

Le FDPNa est incubé à 25°C en milieu tampon à pH = 7,2 en présence d'enzyme. On ajoute de l'hydrazine afin de transformer en hydrazones les trioses-phosphates formés par action de l'*aldolase* sur le substrat. La coloration est développée en milieu très alcalin et appréciée au photocolorimètre à 540 $m\mu$.

Réactifs :

— Le substrat est constitué par du fructose-di-phosphate de Na obtenu par double décomposition à partir du fructose-di-phosphate de calcium selon la technique suivante : peser dans un tube à centrifuger 500 mg de FDPCa, ajouter 6 ml de HCl N/10. Attendre 10 minutes en agitant avec un agitateur de verre, puis ajouter goutte à goutte une solution saturée de $C_2O_4Na_2$ jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité. Centrifuger, filtrer dans un ballon jaugé de 100 ml, rincer le filtre et le tube à l'eau. Ajuster à pH = 7,2 exactement, avec de la soude N. Compléter à 100 ml, mélanger et filtrer. Conserver à —10°C.

— Tampon collidine 0,4 M de pH = 7,2 : dans un ballon taré, peser 2,44 g de collidine (environ 2,56 ml). Remplir d'eau au 3/4. Transvaser en rinçant plusieurs fois dans une éprouvette à bouchage émeri de 50 ml et ajuster le pH à 7,2 à l'aide de HCl N, puis amener le volume à 50 ml. Conserver en chambre froide.

— Sulfate d'hydrazine 0,056 M de pH = 7,2 (0,728 g p. 100 ml) ; ajuster le pH à 7,2 avec de la soude N, filtrer. Conserver en chambre froide.

— Acide trichloracétique à 8 p. 100.

— 2-4- dinitro-phénylhydrazine à 1 p. 1.000 dans HCl 2N ; Filtrer après agitation.

— Solution de soude 0,75 N.

Mode opératoire :

Prélever dans un tube : 0,50 ml de mélange extemporané à parties égales de tampon collidine et de sulfate d'hydrazine ; 0,50 ml de préparation enzymatique ; 1,25 ml de FDPNa 0,01 M ;

Laisser incuber à 25°C pendant 30 et 60 minutes puis stopper la réaction par 2,5 ml d'acide trichloracétique à 8 p. 100.

Préparer un tube témoin avec les mêmes solutions, l'acide étant mis avant la solution enzymatique. Le tube porté au thermostat permettra d'éliminer l'hydrolyse spontanée de FDPNa. Agiter, laisser reposer 10 minutes, centrifuger, décanter, prélever 1 ml du liquide surnageant, ajouter 1 ml de soude 0,75 N, laisser reposer 10 minutes, ajouter 1 ml de solution de 2-4-dinitro-phénylhydrazine, porter le mélange 10 minutes au main-marie à 38°C. Ajouter 7 ml de soude 0,75 N, laisser reposer 10 minutes, puis apprécier la coloration au photocolorimètre à 540 $m\mu$.

Gamme étalon :

Lors de l'étalonnage, on dose simultanément le phosphore libéré en milieu alcalin des trioses-phosphates libérés à partir du FDPNa, par la méthode de FISKE et SUBARROW (44), et les trioses-phosphates libérés dans les mêmes conditions, par la méthode de SIBLEY (84).

Résultats :

Le tableau N° XVII rassemble les résultats exprimés en pourcentages de substrat métabolisé à 25°C en 30 et 60 minutes.

Nous relevons une activité importante pour le muscle dorsal et le muscle cardiaque, pour lesquels les dosages sont effectués sur des homogénats au 1/500 et 1/1.000. On note 46,1 p. 100 de substrat métabolisé en une heure pour le muscle dorsal au 1/500 et 10,1 p. 100 pour la même dilution dans le cœur. Pour les autres organes, les dosages sont effectués sur des préparations enzymatiques diluées au 1/50 et au 1/5, et les pourcentages de substrat métabolisé varient entre 2,8 p. 100 en une heure au 1/50 pour le pancréas, et 29,2 p. 100 pour les testicules au même temps d'incubation et à la même dilution. Dans les hématies, on relève une activité *aldolasique* égale à 27,1 p. 100 de substrat métabolisé en une heure au 1/10. Par contre, le plasma se révèle très pauvre en cette enzyme.

Pourcentages moyens d'activité *Fructose*-1-6 *diphosphoaldolasique* de divers organes et humeurs de *Vipera aspis* (Dosages effectués sur 15 mâles)

Temps d'incubation en minutes	30		60		30		60	
	M	σ	M	σ	M	σ	M	σ
	1/500				1/1.000			
Cœur	7,5	2,2	10,1	1,1	3,3	0,7	4,7	1,1
Muscle dorsal	26,6	3,7	46,1	4,5	14,1	3,2	20,6	5,4
	1/50				1/100			
Reins	14,8	4,2	22,8	3,3	6,5	4,2	10,7	4,4
Foie	7,0	1,9	12,3	2,6	4,5	2,5	6,3	2,3
Poumons	8,0	1,7	10,3	1,7	3,6	2,2	6,0	0,9
Pancréas	2,0	0,8	2,8	0,8	0,8	0,9	1,3	0,7
Testicules	21,3	2,7	29,2	2,5	8,0	1,3	12,5	2,2
Œsophage	13,5	2,3	22,3	2,4	6,8	1,7	9,8	1,8
Estomac	15,5	2,4	23,5	2,7	5,6	1,5	8,1	2,1
Intestin	18,1	1,8	27,1	2,2	8,0	1,6	12,8	3,4
Colon	9,2	1,3	13,7	1,8	4,0	2,0	6,6	1,9
	1/10				1/25			
Hématies	13,2	2,1	27,1	2,4	6,2	0,9	11,0	1,0
	Non dilué				1/2			
Plasma	4,7	1,1	6,8	0,7	2,1	0,3	3,0	0,4

TABLEAU N° XVII

Pour comparaison avec les résultats obtenus par les mêmes méthodes dans le laboratoire, rappelons que le pourcentage de substrat métabolisé après une heure d'incubation est de :

— pour l'hépato-pancréas d'*Helix pomatia* au 1/15 : 19.

— pour le muscle pédieux dilué au 1/40 : 46.

— pour le muscle du squelette de *Rana temporaria* au 1/120 : 40.

— pour le foie de *Rana temporaria* au 1/30 : 20.

— pour le muscle du squelette du cobaye dilué au 1/40 : 80.

— pour le cœur du cobaye dilué au 1/40 : 20.

— pour le rein du cobaye dilué au 1/40 : 20.

— pour le cerveau du cobaye dilué au 1/40 : 10.

— pour le foie de cobaye au 1/30 : 18.

— pour le muscle du squelette du lapin au 1/120 : 70.

— pour le cœur du lapin au 1/40 : 66.

— pour le rein du lapin au 1/40 : 34.

— pour le cerveau du lapin au 1/40 : 12.

— pour le foie du lapin au 1/30 : 19. (DUBIEF) (40).

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans la première partie de notre travail, nous avons pu constater que jusqu'à présent le patrimoine enzymatique des organes de reptiles est resté assez inexploré, bien que les premières publications qui s'y rapportent datent déjà de plus de vingt ans.

Les *Estérases,* les *Phosphatases* et les *Peptidases* sont les enzymes qui ont été le plus souvent recherchées, ainsi que certaines *Oxydo-réductases* et *Transférases.* Les études concernent dans l'ensemble tous les organes des Serpents, mais les références recueillies montrent que la recherche de l'activité enzymatique est inégalement effectuée sur l'un ou l'autre organe. Dans une seconde partie, expérimentale, nous avons essayé de pallier cette lacune, en testant systématiquement la teneur enzymatique de la plupart des organes de *Vipera aspis,* y compris celle du plasma et des hématies.

Les dosages dont les résultats sont exposés ci-dessus ont été effectués sur les organes mâles des Vipères de race *Vipera aspis,* conservées en chambre froide à 4°C. En résumant à l'extrême, nous pouvons dire que :

— pour la recherche de la *lactico-déhydrogénase,* le cœur et le muscle dorsal sont homogénéisés au 1/2.500, la durée de l'incubation étant de trente minutes, les autres organes sont amenés au 1/1.000, les hématies au 1/500, le plasma au 1/10, ce qui dénote dans l'ensemble une très grande richesse en cette enzyme.

— le dosage de la *transaminase SGOT* a été effectué, en trente minutes d'incubation, sur des organes homogénéisés au 1/250, le plasma n'étant pas dilué et les hématies lysées au 1/25.

— quant à la *transaminase SGPT,* elle est recherchée, après une incubation de trente minutes, sur des homogénats d'organes au 1/50, le plasma n'étant pas dilué, les hématies lysées au 1/25. Pour ces deux enzymes, l'activité s'avère moins élevée que dans le foie de la Souris, en restant notable toutefois.

— une activité *cholinestérasique* intense est relevée dans le rein de la Vipère : cet organe est testé au 1/10.000 et fournit, en deux heures d'incubation, une activité totale de 9,5 p. 100, alors que la recherche dans les autres organes de *Vipera aspis* s'effectue à des dilutions au 1/100.

— le dosage de la *phosphatase alcaline*, réalisé avec une incubation de trente minutes, a donné les résultats suivants : les homogénats de cœur, de foie, poumons et reins, au 1/250, ont révélé une activité notable, les autres organes étant au 1/25, le plasma au 1/2 et les hématies au 1/50.

— pour la *phosphatase acide*, avec un même temps d'incubation, le dosage a lieu sur des homogénats au 1/100, y compris pour le lysat d'hématies, le plasma étant testé non dilué.

— la *5-nucléotidase* a été recherchée sur des homogénats au 1/50 en trente minutes d'incubation, excepté pour le rein qui possède une activité de près de 30 p. 100 au 1/250.

— des homogénats au 1/100 des organes de Vipères sont utilisés pour le dosage de l'activité *β-glucuronidasique* en soixante minutes d'incubation, plasma et hématies étant amenés au 1/25.

— la *leucine-amino-peptidase* est dosée en trente minutes d'incubation dans des homogénats au 1/2.500, plasma et hématies étant 10 fois moins dilués.

— la recherche de l'*A.T.P.ase*, en trente minutes d'incubation, s'effectue sur des organes homogénéisés au 1/100, y compris les hématies, le plasma étant utilisé pur.

— quant à la *fructose-1-6 diphosphoaldolase*, en trente minutes d'incubation, elle apparaît dans des homogénats de cœur et de muscle au 1/500, et dans les autres organes, au 1/50 ; le plasma n'est pas dilué, les hématies sont lysées au 1/10.

— enfin en ce qui concerne l'*ornityl-carbamyl-transférase* et l'*invertase*, même en effectuant des incubations prolongées et en diluant au minimum les homogénats, nos recherches sont restées vaines.

Nous avons rassemblé dans le tableau N° XVIII quelques résultats choisis pour concrétiser toute comparaison utile entre les différentes activités enzymatiques dosées dans chaque organe.

Il semble donc probable que les organes de la Vipère possèdent un équipement enzymatique à la fois très varié, puisqu'il comprend au moins des *Hydrolases*, des *Oxydo-réductases* et des *Transférases* et doué d'une activité dont l'intensité varie dans de fortes proportions suivant que l'on considère tel ou tel de ses constituants. Des études ultérieures pourraient peut-être dégager une éventuelle corrélation entre cet équipement enzymatique et les métabolismes correspondants et mettre en rapport cet ensemble avec le mode de vie si particulier de ces Ophidiens.

Activités enzymatiques recherchées	Lactate déhydrogénase		Cholinestérase totale vraie			Transaminase GOT		Transaminase GPT		Phosphatase alcaline		Phosphatase acide		5-nucléotidase		β-glucuronidase		Leucine-amino-peptidase		ATP-ase		Fructose 1-6 diphospho aldolase		Invertase	O.C.T.
Temps d'incubation	30'		120'			30'		30'		30'		30'		30'		60'		30'		30'		30'			
Organes	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé	dilution	p. 100 de substrat métabolisé		
Cerveau			1/1.000	7,5	2,0															1/100	9,4				
Cœur	1/2.500	35,3	1/50	5,6	1,6	1/250	19,2	1/50	4,7	1/250	9,5	1/100	2,8	1/50	33,3	1/100	3,0	1/2.500	2,3	1/100	6,6	1/500	7,5		
Colon	1/1.000	33,5	1/100	15,6	8,1	1/250	4,8	1/50	7,7	1/25	8,2	1/100	4,7	1/50	9,7	1/100	11,2	1/2.500	22,5	1/100	8,8	1/50	9,2		
Estomac	1/1.000	31,3	1/100	47,4	21,7	1/250	7,1	1/50	23,6	1/25	4,5	1/100	3,8	1/50	4,9	1/100	4,7	1/2.500	3,3	1/100	5,9	1/50	15,5		
Foie	1/1.000	18,0	1/100	6,3	1,0	1/250	17,15	1/50	13,0	1/250	17,1	1/100	17,0			1/100	31,5	1/2.500	5,8	1/100	11,2	1/50	7,0		
Intestin	1/1.000	23,0	1/100	9,2	2,2	1/250	6,8	1/50	12,0	1/25	15,7	1/100	7,7	1/50	0,6	1/100	12,0	1/2.500	34,5	1/100	6,4	1/50	18,1		
Muscle	1/2.500	27,0	1/100	8,7	2,2	1/250	11,1	1/50	4,2	1/25	1,8	1/100	5,5	1/50	3,1	1/100	2,3	1/2.500	2,8	1/100	5,6	1/500	26,6		
Œsophage	1/1.000	28,0	1/100	25,8	10,2	1/250	4,7	1/50	9,0	1/25	8,6	1/100	2,5	1/50	14,7	1/100	4,7	1/2.500	2,6	1/100	8,7	1/50	13,5	néant	néant
Pancréas	1/1.000	19,0	1/100	4,4	4,3	1/250	6,7	1/50	28,0	1/25	17,5	1/100	5,6	1/50	4,6	1/100	9,0	1/2.500	3,7	1/100	10,3	1/50	2,0		
Poumons	1/1.000	21,0	1/100	6,5	1,0	1/250	5,7	1/50	5,5	1/250	3,5	1/100	2,6	1/50	21,0	1/100	6,3	1/2.500	3,6	1/100	10,6	1/50	8,0		
Reins	1/1.000	22,6	1/10.000	9,5	0	1/250	11,8	1/50	80,0	1/250	10,7	1/100	77,6	1/250	29,6	1/100	15,2	1/2.500	8,5	1/100	7,7	1/50	14,8		
Testicules	1/1.000	63,3	1/25	7,6	2,5	1/250	4,0	1/50	3,7	1/25	19,6	1/100	2,8	1/50	12,2	1/100	24,3	1/2.500	3,5	1/100	4,0	1/50	21,3		
Plasma	1/10	24,0	1/50	11,6	1,3	ND	3,0	ND	1	1/2	10,0	ND	0,7			1/25	15,5	1/250	3,0			ND	4,7		
Hématies	1/500	36,5	1/50	10,6	6,5	1/25	14,3	1/25	6	1/50	6,0	1/100	5,8	1/50	2,7	1/25	2,0	1/250	7,0	1/100	15,5	1/10	13,2		

TABLEAU N° XVIII

Vu,
Le 3 juin 1969.

Le Président du Jury :
G. DASTUGUE.

Vu et permis d'imprimer N° Ph 4/69
Le 5 juin 1969.

Le Doyen de la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie :
G. MEYNIEL.

BIBLIOGRAPHIE

(1) AGID R., DUGUY R., SAINT-GIRONS H. *J. Physiol.*, 1961, (53), (6), 807.
(2) ARGAUD R., BILLARD G. *C.R. Soc. Biol.*, 1911, (71), 583.
(3) ARVY L. *C.R. Soc. Biol.*, 1959, (153), 1736.
(4) ARVY L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1963, (106), 472.
(5) ARVY L. *Ann. Nutrit. Aliment. Fr.*, 1963, (17), (1), A 331 - A 373.
(6) AUGUSTINSSON K.B. *Acta Chem. Scand.*, 1959, (13), (6), 1097-1105.
(7) AUGUSTINSSON K.B., NACHMANSOHN D. *Traité de Biochimie Générale*, 1964, (2), 408.
(8) BARRIO A. *Rev. Inst. Malbian*, 1954, (16), 204.
(9) BASTIDE J. *Thèse Doct. Univ. Pharm. Clermont-Ferrand*, 1968.
(10) BASTIDE P., BAUDON J., DASTUGUE G. et REBIERE J.-P. *Ann. Biol., Clin.*, 1960, 5-6, 307.
(11) BASTIDE P., BAUDON J., MEUNIER S., DASTUGUE G. *Pathol. Biol.*, 1962, (10), 445.
(12) BASTIDE P., BALLADE Ch., DASTUGUE G. *Journal de physiologie*, 1963, (55), 194.
(13) BASTIDE P., BAUDON J., MEUNIER S., DASTUGUE G. *Ann. Biol. Clin.*, 1963, (21), 255.
(14) BASTIDE P., RIGAL M.-Th., DASTUGUE G. *C.R. Soc. Biol.*, 1966, (160), (8-9), 1594.
(15) BASTIDE P., LAUMIN A.-M., DASTUGUE G. *Journal de physiologie*, 1967, (59), 208.
(16) BESSEY O.A., LOWRY O.H., BROCK M.S. *J. Biol. Chem.*, 1946, (164), 321.
(17) BILLARD, MOUGEOT et MERLE (1914). Cités par DASTUGUE G. *Bulletin Historique et Scientifique de l'Auvergne*, 1941, (61), 36.
(18) BODANSKY O. *Cancer*, 1954, (7), 1191.
(19) BOULANGER P. *Arch. Sci. Biol.*, 1955, (39), 593.
(20) BOVET F. *Experiencia*, 1947, (3), 283
(21) BRAGDON D.E. et Mc MANUS J.F.A. *Anat. Rec.*, 1952, (112), 314.
(22) BRATTON A.C., MARSHALL E.K. *J. Biol. Chem.*, 1939, (128), 537.
(23) BRAUNSTEIN A.E., KRITZMANN M.G. *Enzymologia*, 1937, (2), 129.
(24) BROWN R.W., GRISOLIA S. *J. Lab. Clin. Med.*, 1959, (54), 617-620.
(25) CABAUD P.G., WROBLESWKI F. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1958, (30), 234.
(26) CAMPBELL D.M. *Biochem. J.*, 1962, (82), 34.

(27) CHAMBON A. *Thèse Doct. Pharm. Clermont-Ferrand,* 1959.
(28) CHEN Y.M., CHAVIN W. *Experiencia,* 1967, 23.
(29) CHEN-CHUNG YANG, LIAU-CHENG HUANG and TA-CHENG TUNG. *J. Formosan Med. Assoc.,* 1954, (53), 1.
(30) CHUAN-CHIUNG CHANG, CHEN-YUAN LEE. *J. Formosan Med. Assoc.,* 1955, (54), 103.
(31) DASTUGUE G., PITON L. *Revue Médicale,* 1934, (6), 13.
(32) DASTUGUE G., DODEL P., PITON L. *Congrès de Médecine de Barcelone,* 1934, (2), 64.
(33) DASTUGUE G. *Bulletin Historique et Scientifique de l'Auvergne,* 1941, (61), 36.
(34) DASTUGUE G., BASTIDE P., DUBIEF V. *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 1956, (16), 196.
(35) DASTUGUE G., BAUDON J., BASTIDE P., CARCASSIN M. *Ann. Biol. Clin.,* 1959, (17), 435.
(36) DASTUGUE G., BASTIDE P., MARTIN P. *C.R. Soc. Biol.,* 1965, (159), (12), 2367.
(37) DODEL P., DASTUGUE G., DARRAUD, Mme. *Société de Physique Biologique de France,* 1940-41, (15), (46), 11.
(38) DODEL P., DASTUGUE G., DARRAUD, Mme. *Société de Physique Biologique de France,* 1941, (15), (47), 3.
(39) DOERY H.M. et PEARSON J.E. *Biochem. J.,* 1964, (92), (3), 599.
(40) DUBIEF V. *Thèse Doct. Univ. Pharm. Clermont-Ferrand,* 1956.
(41) EKRENSING R.H.E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 1964, (117), (2), 370.
(42) Enzyme Nomenclature. *Recommendations* 1964 *of the International Union of Biochemistry.* Elsevier publishing company, Amsterdam, London, N.Y., 1965.
(43) FISCHER E., KOHTES L. *Helv. Chim. Acta.,* 1951, (34), 1123.
(44) FISKE C., SUBBAROW Y. *J. Biol. Chem.,* 1929, (81), 629.
(45) FLEURY P., EBERHARD R. *Ann. Biol. Clin.,* 1951, (9), 453.
(46) FOUAD KHALIL, GABER HAGGAG G. *Z. Vergleich. Physiol. Dish.,* 1960, (43), (3), 269.
(47) GABE M. *Ann. Histochim.,* 1959, (4), 23.
(48) GOLDBARG J.A., RUTENBURG A.M. *Cancer,* 1958, (2), 283.
(49) GOSLAR H.G. *Acta Histochem.,* 1964, (17), (1-4).
(50) IZARD Y., DETRAIT J., BOQUET P. *Ann. Inst. Pasteur,* 1961, (100), 538-545.
(51) JOY Mme, DASTUGUE G. *Comptes rendus des Séances de la Société de Physique Biologique de France,* 1940-1941, (45), 3.
(52) JOY Mme, DASTUGUE G. *C.R. Soc. Phys. Biol.,* 1942, (57), 77.
(53) JOY Mme, DASTUGUE G. *C.R. Soc. Phys. Biol.,* 1943, (17), 61.
(54) KASWIN A., SERFATY A. *C.R. Soc. Biol.,* 1945, CXXXIX, 1070.
(55) KEARNEY E.B., SINGER T.P. *Archiv. Biochem. Biophys.,* 1951, (33), 377.
(56) KESAMI WAKWI and SAJU KAWACHI. *Yahugaku Zasshi,* 1959, (79), 1177.
(57) KING E.J., GARNER, IN KING E.J. *Microanal. in Medic. Biochem., Churchill ed., London,* 1947.
(58) KULKA R.G., DUSKIN D. *Biochim. Biophys. Acta,* 1964, (91), 506-514.
(59) LABECKA S., OLEDZKA-SLOTWINKA H., OLOWSKA L., PALACZ O., ROZEWICKA L., WESOLOWSKI H. *Bullet. Assoc., Anat.,* 1964, (121), 200.
(60) LAUMIN A.-M., RIGAL M.-Th., BASTIDE P., DASTUGUE G. *C.R. Soc. Biol.,* 1966, (160), (10), 1889.
(61) LEE C.Y., CHANG C.C., KAMIJO K. *Biochem. J.,* 1956, (62), 582.
(62) LINDERSTROM-LANG (1929). Cité par POLONOVSKI M. et Coll. *Traité de Biochimie Générale,* 1964, (2), 497.

(63) LOHMANN (1929). Cité par POLONOVSKI M. et coll. *Traité de Biochimie Générale,* 1964, (2), 366.
(64) MARJOTA M., DUGUY R., SAINT-GIRONS H. *Arch. Anat. Micr. Morphol. Exper. Fr.,* 1961, (50), (2), 233-249.
(65) MARTIN G. *Thèse Doct. Pharm. Clermont-Ferrand,* 1962.
(66) MARTIN Ph. *Thèse Doct. Pharm. Clermont-Ferrand,* 1965.
(67) MASTER R.W.P. *J. Chromatog.,* 1964, (14), (2), 205.
(68) MEJBAUM W., CHARGAFF S., DAVIDSON J.N. *Acad. Press. N.Y.,* 1955, (I), 301.
(69) MEYERHOF O., LOHMANN K. *Naturwiss,* 1934, (22), 220.
(70) MITSUDA H. *Bull. Inst. Chem. Research. Kyoto Univ.,* 1965, (34), 165.
(71) MOUNTER L.A. *Biochem. J.,* 1951, (50), 122.
(72) NELSON J.M. *J. Biol. Chem.,* 1944, (145), 153.
(73) NEUBERG, NIEMAN (1905). Cités par POLONOVSKI M. et coll. *Traité de Biochimie Générale,* 1964, (2), 329.
(74) NIKOL'SKAYA I.I., KISLINA O.S., TIKHONENKO T.I. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR,* 1964, (157), 475.
(75) NIKOL'SKAYA I.I., KISLINA O.S., TIKHONENKO T.I. *Biokhimiya,* 1965, (30), 107.
(76) PALACZ O. *Folia Biol.,* 1963, (11), (1), 121-31.
(77) PERRY S.V. *Methods in Enzymology* 1955, (11), 582.
(78) PLAZONNET M.-P. *Thèse Doct. Pharm. Clermont-Ferrand,* 1968.
(79) REITMAN S., FRANKEL S. *Amer. J. Clin. Path.,* 1957, 28, 56.
(80) RIGAL M.-Th. *Thèse Doct. Pharm. Clermont-Ferrand,* 1967.
(81) SADAAKI IWANAGA. *Yakugaku Kenkyu,* 1956, (28), 317.
(82) SCHAPIRA F. *Thèse Doct. Sciences,* Paris, 1959.
(83) SCHNEIDER W.C. *J. Biol. Chem.,* 1945, (165), 585-593.
(84) SIBLEY J.A., LEHNINGER A. *J. Biol. Chem.,* 1949, (177), 859.
(85) SMITH E.L., SPACKMAN E.L. *J. Biol. Chem.,* 1952, (199), 801.
(86) STRAUB F.B. *Biochem. J.,* 1940, (34), 483.
(87) TABORDA A.R., TABORDA L.C., WILLIAMS J.N. *J. Biol. Chem.,* 1952, (195), 207.
(88) TABORDA A.R., TABORDA L.C., WILLIAMS J.N. *J. Biol. Chem.,* 1957, (194), 227.
(89) TALALAY P., FISHMAN W.H., HUGGINS C. *J. Biol. Chem.,* 1946, (166), 757.
(90) TOMOJI SUZUKI, SADAAKI IWANAGA. *Yokugaku Zasshi,* 1958, (78), 354.
(91) TOURNAIRE D., BASTIDE P., DASTUGUE G. *C.R. Soc. Biol.,* 1966, (160), 1597.
(92) VINCENT D., SEGONZAC G., SESQUE G. *Rev. Fr. Et. Clin. Biol.,* 1961, (6), 1083-1086.
(93) WONG S.Y. *J. Biol. Chem.,* 1923, (55), 421.
(94) WONG S.Y. *J. Biol. Chem.,* 1928, (77), 409.
(95) YANG C.C., CHANG C.C. *Tai-wan i Hsueh Hui Tse Chih,* 1960, (59), (9), 961.
(96) ZELLER E.A., MARITZ A. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta,* 1945, (3), C 19-20.
(97) ZELLER E.A., ISELIN B., MARITZ A. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta,* 1946, (4), 233.
(98) ZELLER E.A. *Experiencia,* 1947, (3), 375.
(99) ZELLER E.A. *Advances in Enzymology,* 1948 (8), 459.
(100) ZELLER E.A. *Helv. Chim. Acta,* 1949, (32), 94.
(101) ZELLER E.A. UTZ D.C. *Helv. Chim. Acta,* 1949, (32), 338.
(102) ZWISLER O. *Behringwerke Mitt.,* 1964, (43), 293.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 15

PREMIERE PARTIE
RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1. — Anatomie et Physiologie de la Vipère 19
Chapitre 2. — Activités enzymatiques 23

DEUXIEME PARTIE
RECHERCHES EXPERIMENTALES

Chapitre 1. — Conservation des animaux 35
Chapitre 2. — Dosages au niveau des organes 37
A) Protéines Biurétiques.
B) A.D.N., A.R.N.
Chapitre 3. — Dosages au niveau du sang 43
A) Hématocrite.
B) Vitesse de Sédimentation.
C) Dosage de l'Hémoglobine.
Chapitre 4. — Obtention des préparations enzymatiques 47
Chapitre 5 . — Activité lactico déshydrogénasique (1.1.1.27.) 51
Chapitre 6. — Activités cholinestérasiques (2.1.1.7.), (2.1.1.8.) 55
Chapitre 7. — Activités transaminasiques G.O.T., G.P.T. (2.6.1.1.), (2.6.1.2.) 61
Chapitre 8. — Activités phosphatasiques (3.1.3.1.), (3.1.3.2.) 67
Chapitre 9. — Activité 5-nucléotidasique (3.1.3.5.) 71
Chapitre 10. — Activité β-glucuronidasique (3.2.3.1.) 75
Chapitre 11. — Activité leucine-amino-peptidasique (3.4.1.1.) 79
Chapitre 12. — Activité A.T.P.asique (3.6.1.3.) 83
Chapitre 13. — Activité aldolasique (4.1.2.13.) 87
Résumé et Conclusions générales 91